

Всероссийская конференция «Биомедицинская химия: наука и практика»

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ИММОБИЛИЗАЦИЯ НА ОКИСЛЕННОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЕ L-АСПАРАГИНАЗЫ  
ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ФЕРМЕНТА

А.Н. Шишпарёнок<sup>1\*</sup>, С.А. Королёва<sup>2</sup>, И.Д. Злотников<sup>3</sup>, Ю.А. Гладиллина<sup>1</sup>,  
М.В. Покровская<sup>1</sup>, С.С. Александрова<sup>1</sup>, Д.Д. Жданов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, Погодинская ул., 10; \*e-mail: a.shishparyonok@yandex.ru

<sup>2</sup>Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы (Университет РУДН),  
117198, Москва, Миклухо-Маклая ул., 6

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
119192, Москва, Ленинские горы, 1

Мембрана бактериальной целлюлозы (БЦ) может быть модифицирована для ковалентной иммобилизации биологических макромолекул. Одним из типов модификации является окисление. Окисленная мембрана БЦ (ОБЦ) может применяться как матрица для ковалентной иммобилизации ферментов. Для ковалентной иммобилизации мезофильной L-аспарагиназы (L-ASNase) из *Erwinia carotovora* (EwA) и повышения её стабильности использовали химическую модификацию мембраны БЦ посредством окисления перйодатом натрия (NaIO<sub>4</sub>). ИК-спектроскопия подтвердила иммобилизацию L-ASNase EwA на мембранах ОБЦ. Иммобилизация фермента увеличивала оптимум его температурной активности на 15°C и повышала температуру инактивации до 60°C. Мембрана ОБЦ может служить потенциальным носителем для ковалентной иммобилизации ферментов с целью улучшения их фармакологических свойств за счёт увеличения термостабильности.

**Ключевые слова:** L-аспарагиназа; бактериальная целлюлоза; иммобилизация; термостабильность

**DOI:** 10.18097/BMCRM00234

ВВЕДЕНИЕ

L-аспарагиназа (L-ASNase) — фермент класса гидролаз, применяемый для лечения острого лимфобластного лейкоза [1–3]. Фермент катализирует расщепление аспарагина с образованием аспарагиновой кислоты и аммиака. Поскольку лейкозные клетки не способны синтезировать аспарагин, истощение его пула в микроокружении приводит к активации апоптоза и клеточной гибели. *Escherichia coli* и *Erwinia chrysanthemi* — основные продуценты L-ASNase, которые используют в настоящее время в клинической практике. Как и большинство терапевтических ферментов, L-ASNase имеют короткий период полужизни и они иммуногенны. Их применение вызывает гиперчувствительность и нейротоксичность [4].

Одним из способов решения перечисленных ограничений является повышение стабильности фермента, отражением которой является термостабильность. Повышение термостабильности способствует увеличению времени циркуляции L-ASNase в организме и минимизирует побочные эффекты за счёт снижения терапевтической дозы. Также термостабильность обеспечивает стабильность при длительном хранении [5]. Ранее была

установлена корреляция между термодинамической стабильностью L-ASNase из *Erwinia carotovora* (EwA) и её цитотоксичностью [6]. Улучшение термостабильности имеет решающее значение для применения L-ASNase при предварительной обработке пищевых продуктов [7] для снижения количества акриламида [8].

Для улучшения термостабильности L-ASNase в основном используют генно-инженерные подходы. С помощью гетерологичной экспрессии и рационального дизайна была улучшена термостабильность L-ASNase из *Rhizomucor miehei* и *Acinetobacter soli* [9]. Полученные L-ASNase обладали улучшенной стабильностью, периодом полужизни, пониженной иммуногенностью, противораковой активностью *in vitro* и *in vivo*. Также с помощью генной инженерии была улучшена термостабильность L-ASNase из *E. carotovora*, *E. chrysanthemi* [10] и *Bacillus licheniformis* [11].

Несмотря на то, что есть множество примеров ферментов, которые были стабилизированы при помощи введения одной или двух мутаций [12], до сих пор не существует универсальной стратегии стабилизации “любого” белка путём ограниченного количества рационально спроектированных мутаций [10].

**Принятые сокращения:** L-ASNase – L-аспарагиназа; EwA – L-ASNase из *Erwinia carotovora*, БЦ – бактериальная целлюлоза, ОБЦ – окисленная бактериальная целлюлоза.



Другим подходом для увеличения стабильности L-ASNase является иммобилизация, например, конъюгация с полиэтиленгликолем (ПЭГ) [13, 14]. Ранее в эксперименте по денатурации EwA было показано, что этот фермент в свободной форме имеет пониженную термодинамическую стабильность и быстро инактивируется в присутствии мочевины [6], поэтому имеет ограниченный потенциал в качестве противолейкозного препарата. Для улучшения стабильности EwA была конъюгирована с полиэтиленгликолем [15].

В данной работе мы предложили подход для увеличения стабильности фермента EwA путём его иммобилизации на плёнке окисленной бактериальной целлюлозы (ОБЦ).

## МЕТОДИКА

### Получение мембран БЦ

Штамм *Komagataeibacter hansenii* (ВКПМ № В-11239) культивировали методом статической ферментации для получения БЦ. Для культивирования использовали среду Хестрина-Шрамма следующего состава: 10 г/л глюкозы (“Sigma”, США), 5 г/л пептона (“Диаэм”, Россия), 5 г/л дрожжевого экстракта (“PanReas Applichem”, Испания), 1.15 г/л лимонной кислоты (“Merck Millipore”, Германия) и 2.7 г/л  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  (“PanReas Applichem”, Испания), pH 4.5. Культуральную среду разливали по 200 мл в 1 л колбы и автоклавировали в течение 20 мин при 120°C. Для получения БЦ к среде добавляли 1 мл 99% этилового спирта и 20 мл среды с *K. hansenii* (в логарифмической стадии роста), разливали в 24-луночные культуральные стерильные планшеты (“Wuxi NEST Biotechnology”, Китай) по 2.5 мл и помещали в инкубатор (26°C). Мембраны БЦ снимали через 4 дня и обрабатывали для удаления остатков бактерий и среды с помощью 0.1 М NaCl (“Диаэм”) и 1% додецилсульфата натрия (“Merck Millipore”).

### Реакция окисления мембран БЦ

Для реакции окисления мембран БЦ с помощью  $\text{NaIO}_4$  была использована и модифицирована методика, описанная ранее Vasconcelos и соавт. [16]. Очищенные влажные мембраны БЦ погружали в раствор KCl/HCl (250 мл 0.2 моль/л раствора KCl и 670 мл 0.2 моль/л раствора HCl) при 25°C на 24 ч. Затем образцы БЦ погружали в 200 мл 1% (мас./об.)  $\text{NaIO}_4$  (“Кемстор”, Россия), растворённого в KCl/HCl. Реакция окисления протекала в отсутствие света при орбитальном перемешивании (100 об/мин) в течение 5 ч при 50°C. После этого в реакционную смесь добавляли 12 мл этиленгликоля (“Экос-1”, Россия) для нейтрализации избытка  $\text{NaIO}_4$  и инкубировали в течение 1 ч при 22°C при орбитальном перемешивании. Затем ОБЦ несколько раз промывали деионизированной водой.

### Физическая характеристика плёнок

Для мембран БЦ измеряли массу, толщину и содержание воды. Массу определяли путём взвешивания пяти мембран ОБЦ или БЦ

на аналитических весах при 25°C. Содержание воды и адсорбцию (%) определяли с помощью стандартных методик, описанных Wu и соавт. [17].

### Иммобилизация EwA на ОБЦ

Раствор EwA (595 МЕ/мг, молекулярная масса 37 кДа, получена в лаборатории медицинской биотехнологии ИБМХ) готовили в 0.05 М буфере HEPES (pH 8.0). Влажные мембраны ОБЦ помещали в 24-луночный планшет, добавляли к ним разведённый в 0.05 М HEPES 1 мл раствора EwA в концентрации 0.05 мг/мл (28 МЕ/мл) и инкубировали при 4°C в течение 12 ч. После иммобилизации EwA мембраны трижды промывали HEPES для удаления несвязанной EwA.

### Инфракрасная спектроскопия

ИК-спектры были записаны для БЦ, ОБЦ и ОБЦ+EwA с использованием ИК-Фурье-микроскопа МИКРАН-3 (“Симекс”, Россия). Спектральное разрешение составляло 4  $\text{см}^{-1}$ , в режиме 40 сканов в спектральном диапазоне 4000–1000  $\text{см}^{-1}$  в режиме поглощения.

### Определение термостабильности EwA, иммобилизованной на ОБЦ

Термодинамическую стабильность фермента, иммобилизованного на БЦ, определяли по изменению активности EwA при инкубации в присутствии L-аспарагина. Плёнку ОБЦ инкубировали в 50 мл 0.05 М HEPES буфере в диапазоне температур 45–60°C в течение 1–3 ч. Каждые 10 мин отбирали 100 мкл пробы для определения концентрации ионов аммония методом прямой несселеризации [18]. За единицу активности фермента принимали количество фермента, которое катализирует высвобождение 1 мкмоль аммиака за 1 мин при 37°C. Данные активности представляли как процент от максимальной активности свободного фермента.

### Статистика

Измерения проводили в четырёх независимых повторах. Для количественных данных рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение с использованием программного обеспечения MS Office Excel 2016. Значения считали статистически достоверными при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Физико-химические характеристики ОБЦ

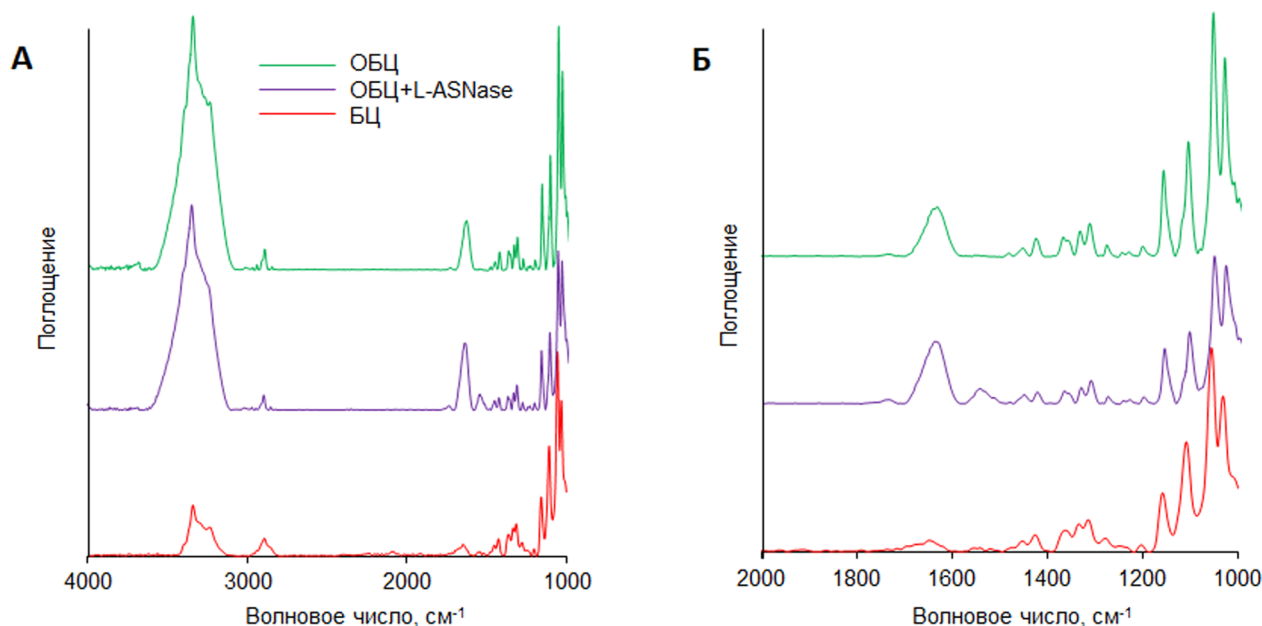
Нами было выявлено, что в результате окисления БЦ изменяются её основные физико-химические характеристики. Плёнки ОБЦ обладали меньшей массой, диаметром и адсорбционной ёмкостью, чем плёнки БЦ (табл. 1). Потеря массы БЦ после окисления составила 23%.

### Определение химического состава ОБЦ

Для всех образцов на ИК-спектрах были характерны пики (рис. 1), соответствующие химической структуре

**Таблица 1.** Физико-химические характеристики БЦ и ОБЦ

Параметр	ОБЦ	БЦ
Масса, мг	340±10	410±50
Диаметр, мм	14.00±0.10	16.00±0.05
Водоудерживающая способность, %	97.2±0.1	97.9±0.1
Адсорбционная ёмкость, %	3631±167	4752±170
Количество иммобилизованной EwA, %	65±3.2	82±2.5

**Рисунок 1.** ИК-спектры плёнок БЦ, ОБЦ и ОБЦ с иммобилизованной L-ASNase EwA. (А) Спектральный диапазон 4000–1000 см<sup>-1</sup>. (Б) Спектральный диапазон 2000–1000 см<sup>-1</sup>.

целлюлозы: валентное колебание –ОН (3325 см<sup>-1</sup>) и симметричное изгибание (1336 см<sup>-1</sup>); алифатические валентные колебания СН (2874 см<sup>-1</sup>); деформационные колебания СН (1635 см<sup>-1</sup>, 1419 см<sup>-1</sup>, 1356 см<sup>-1</sup>); асимметричное растяжение гликозидной связи С–О–С (1155 см<sup>-1</sup>) и растяжение связи С–О (1055 см<sup>-1</sup>).

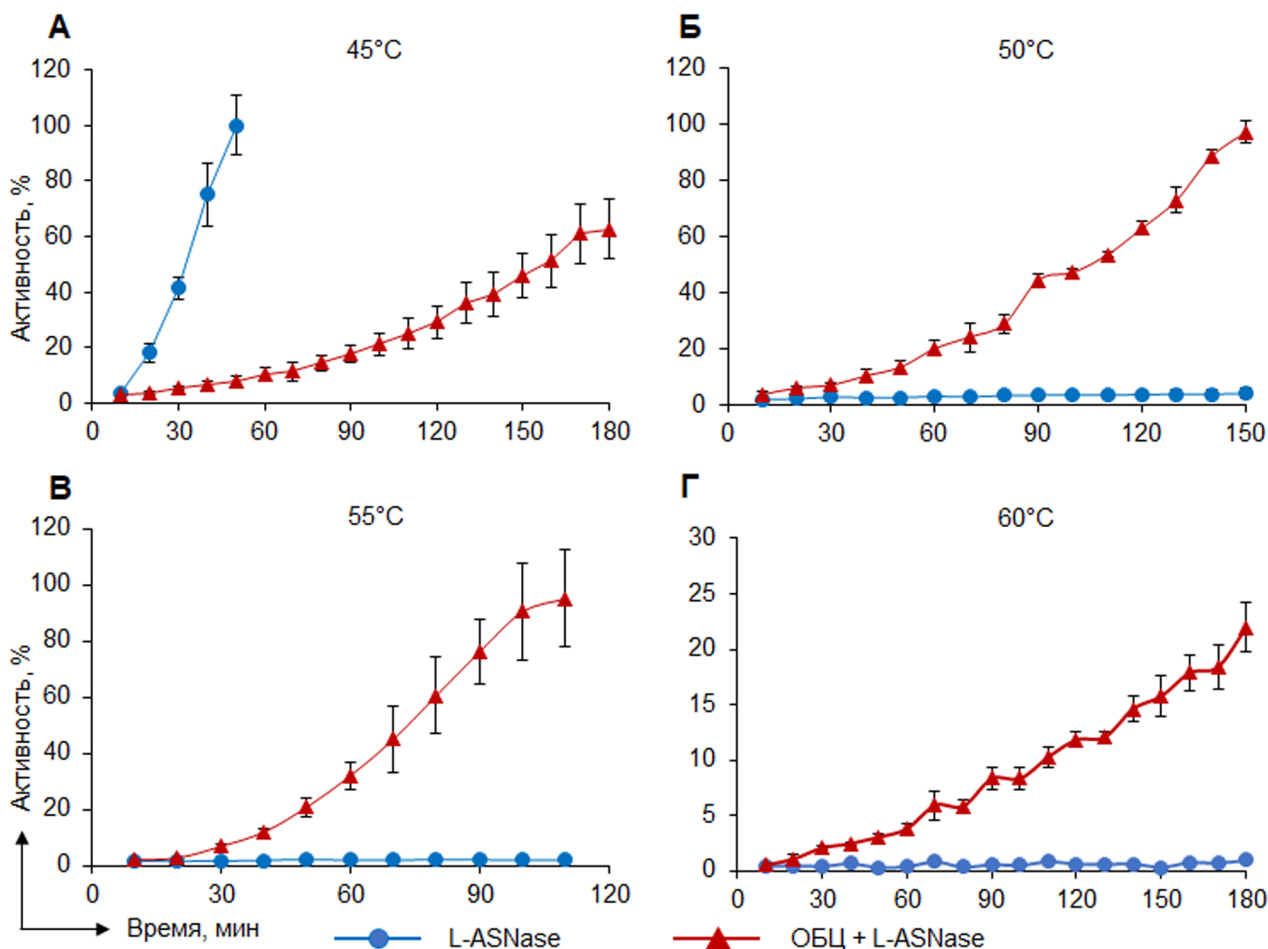
В результате окисления БЦ выявлен новый пик при 1646 см<sup>-1</sup>, соответствующий симметричному растяжению связи С=О, отнесенной к альдегидной группе, которая образуется в результате окислением целлюлозы NaIO<sub>4</sub>. Включение EwA в мембрану ОБЦ приводило к появлению в ИК-спектре характерного пика при 1556 см<sup>-1</sup>, что соответствует растяжению связи С–N, который относится к аминной группе. Увеличение интенсивности полосы 1646 см<sup>-1</sup>, наложенной на карбонильную группу (С=О), связано с симметричным растяжением связи С=N, которое характерно для образования иминной группы. Наличие этой полосы указывает на образование ковалентной связи ОБЦ с EwA.

#### *Термостабильность L-ASNase EwA при иммобилизации на ОБЦ*

Известно, что L-ASNase EwA проявляет максимальную активность при 45°C [3, 15]. При данной температуре для свободного фермента

отмечена максимально возможная активность через 50 мин инкубации (рис. 2А). Активность фермента, ковалентно иммобилизованного на ОБЦ, была существенно ниже и при данной температуре достигла 62.6±10.6% от максимальной через 180 мин инкубации. Увеличение температуры до 50°C вызывало полную инактивации свободного фермента (рис. 2Б), в то время как активность L-ASNase, иммобилизованной на ОБЦ, существенно увеличивалась и достигала максимального уровня через 150 мин инкубации. Фермент, иммобилизованный на ОБЦ, сохранял активность и при увеличении температуры до 55°C (рис. 2В). Более того, его активность увеличилась до максимального уровня уже через 100 мин инкубации. Однако увеличение температуры до 60°C приводило к понижению активности фермента (рис. 2Г) и через 180 мин инкубации активность достигла лишь 21.8±2.5%.

Таким образом, L-ASNase EwA, ковалентно иммобилизованная на ОБЦ, обладала более широким оптимумом температур по сравнению с нативным ферментом. Иммобилизация на ОБЦ позволила сохранить активность фермента при повышении температуры на 15°C от температурного оптимума для данного фермента.



**Рисунок 2.** Зависимость активности фермента L-ASNase EwA от температуры. Фермент иммобилизовали ковалентно на ОБЦ или добавляли в буфер HEPES в свободной форме. Мембрану с ферментом или фермент в свободной форме помещали в буфер с субстратом и инкубировали в диапазоне температур 45–60°C. Показана активность ферментов на плёнках, инкубированных при (А) 45°C, (Б) 50°C, (В) 55°C или (Г) 60°C.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Большинство ферментов с терапевтическим потенциалом не обладают в нативной форме оптимальными фармакологическими свойствами, так как имеют низкую стабильность в условиях организма. Одним из перспективных носителей для иммобилизации ферментов является БЦ. БЦ имеет высокую пористость, площадь поверхности и большое количество гидроксильных групп — свойства, благоприятствующие её химической модификации [16]. Ковалентное связывание с целлюлозными носителями повышает активность и/или термическую стабильность иммобилизованного фермента [20]. Ранее было показано, что иммобилизация липазы [21], лецитазы [22] и лакказы [23] на окисленную  $\text{NaIO}_4$  БЦ приводила к увеличению стабильности ферментов, что и предопределило выбор данного способа модификации БЦ.

Ионы периодата ( $\text{IO}_4^-$ ) избирательно окисляют вторичные гидроксильные группы в целлюлозе за счёт разрыва связи C2-C3 в глюкопиранозидном кольце. В результате этого в молекуле глюкозы образуются

две альдегидные группы [24], а морфология исходного целлюлозного материала сохраняется. Альдегидные группы пригодны для введения различных групп-заместителей, таких как карбоновые кислоты, гидроксильные группы или имины [25]. В окисленной целлюлозе альдегидные группы ( $-\text{HC}=\text{O}$ ) образуют иминную связь со свободными аминогруппами белков ( $-\text{C}=\text{NR}$ ), которая затем перегруппировывается с образованием стабильного амина ( $-\text{C}-\text{NHR}$ ) [26]. Кроме того, процесс окисления снижает плотность отрицательного заряда, увеличивая возможность межмолекулярных взаимодействий с ферментами [25].

Ранее было показано, что модификация остатков лизина, расположенных на поверхности, влияет на стабильность ферментов. Например, для стабилизации пероксидазы хрена использовали химические или генетические модификации трёх экспонированных на поверхности лизинов [27]. В мономере EwA из 20 аминокислотных остатков лизина 14 расположены на поверхности и доступны для разных модификаций [28]. Мы полагаем, что по аналогии с пероксидазой, при иммобилизации EwA на ОБЦ лизины связались

с альдегидными группами окисленной целлюлозы. Это привело к стабилизации белка и повышению его термодинамических характеристик. Вероятно, это происходило из-за изменения конформации белка при иммобилизации, а также за счёт снижения активности молекул воды вблизи белковой макромолекулы [15]. Таким образом, ОБЦ можно рассматривать в качестве носителя для ферментов для повышения их стабильности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Произведена химическая модификация мембраны БЦ периодатом натрия. Ковалентная иммобилизация терапевтической L-ASNase EwA на окисленную мембрану БЦ позволила увеличить термическую стабильность фермента на 15°C и повысить температуру инактивации до 60°C. Мембрана ОБЦ может служить потенциальным носителем для ковалентной иммобилизации ферментов с целью улучшения их фармакологических свойств за счёт увеличения термостабильности.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800499-5).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Aleksandrova, S.S., Abakumova, O.Yu., Podobed, O.V., Melik-Nubarov, N.S., Kudryashova, E.V., Grishin, D.V., Archakov, A.I. (2015) Bacterial recombinant L-asparaginases: Properties, structure and anti-proliferative activity. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **61**(3), 312–324. DOI: 10.18097/PBMC20156103312
2. Alexandrova, S.S., Gladilina, Y.A., Pokrovskaya, M.V., Sokolov, N.N., Zhdanov, D.D. (2022) Mechanisms of development of side effects and drug resistance to asparaginase and ways to overcome them. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **68**(2), 104–116. DOI: 10.18097/PBMC20226802104
3. Dumina, M.V., Eldarov, M.A., Zdanov, D.D., Sokolov, N.N. (2020) L-asparaginases of extremophilic microorganisms in biomedicine. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **66**(2), 105–123. DOI: 10.18097/PBMC20206602105
4. Tsegaye, K., Tsehai, B.A., Getie, B. (2024) Desirable L-asparaginases for treating cancer and current research trends. *Front. Microbiol.*, **15**, 1269282. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1269282

5. Darnal, S., Patial, V., Kumar, V., Kumar, S., Kumar, V., Padwad, Y.S., Singh D. (2023) Biochemical characterization of extremozyme L-asparaginase from *Pseudomonas sp.* PCH199 for therapeutics. *AMB Express*, **13**(1), 22. DOI: 10.1186/s13568-023-01521-2
6. Papageorgiou, A.C., Posypanova, G.A., Andersson, S.A., Sokolov, N.N., Krasotkina, J. (2008) Structural and functional insights into *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *FEBS J.*, **275**(17), 4306–4316. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06574.x
7. Zhang, W., Dai, Q., Huang, Z., Xu, W. (2023) Identification and thermostability modification of the mesophilic L-asparaginase from *Limosilactobacillus secaliphilus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **196**(6), 3387–3401. DOI: 10.1007/s12010-023-04715-3
8. Jiao, L., Chi, H., Xia, B., Lu, Z., Bie, X., Zhao, H., Lu, F., Chen, M. (2022) Thermostability improvement of L-asparaginase from *Acinetobacter soli* via consensus-designed cysteine residue substitution. *Molecules*, **27**(19), 6670. DOI: 10.3390/molecules27196670
9. Shishparenok, A.N., Gladilina, Y.A., Zhdanov, D.D. (2023) Engineering and expression strategies for optimization of L-asparaginase development and production. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**(20), 15220. DOI: 10.3390/ijms242015220
10. Kotzia, G.A., Labrou, N.E. (2009) Engineering thermal stability of L-asparaginase by *in vitro* directed evolution. *FEBS J.*, **276**(6), 1750–1761. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.06910.x
11. Chi, H., Wang, Y., Xia, B., Zhou, Y., Lu, Z., Lu, F., Zhu, P. (2022) Enhanced thermostability and molecular insights for L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* via structure- and computation-based rational design. *J. Agric. Food Chem.*, **70**(45), 14499–14509. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c05712
12. Bjørk, A., Dalhus, B., Mantzilas, D., Sirevåg, R., Eijsink, V.G.H. (2004) Large improvement in the thermal stability of a tetrameric malate dehydrogenase by single point mutations at the dimer-dimer interface. *J. Mol. Biol.*, **341**(5), 1215–1226. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.06.079
13. Meneguetti, G.P., Santos, J.H.P.M., Obreque, K.M.T., Barbosa, C.M.V., Monteiro, G., Farsky, S.H.P., Marim de Oliveira, A., Angeli, C.B., Palmisano, G., Ventura, S.P.M., Pessoa-Junior, A., de Oliveira Rangel-Yagui, C. (2019) Novel site-specific PEGylated L-asparaginase. *PLoS ONE*, **14**(2), e0211951. DOI: 10.1371/journal.pone.0211951
14. Feenstra, L.R., Gehring, R., van Geijlswijk, I.M., König, T., Prinsen, H.C.M.T., Vandemeulebroecke, K., Lammens, T., Krupa, A., Teske, E. (2022) Evaluation of PEG-L-asparaginase in asparagine suppression and anti-drug antibody development in healthy Beagle dogs: A multi-phase preclinical study. *Veterinary J.*, **286**, 105854. DOI: 10.1016/j.tvjl.2022.105854
15. Melik-Nubarov, N.S., Grozdova, I.D., Lomakina, G.Y., Pokrovskaya, M.V., Pokrovski, V.S., Aleksandrova, S.S., Abakumova, O.Y., Podobed, O.V., Grishin, D.V., Sokolov, N.N. (2017) PEGylated recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*: Production, properties, and potential applications. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **53**(2), 165–172. DOI: 10.1134/S0003683817020119
16. Vasconcelos, N.F., Andrade, F.K., Vieira, L.D.A.P., Vieira, R.S., Vaz J.M., Chevallier, P., Mantovani, D., Borges, M.D.F., Rosa, M.D.F. (2020) Oxidized bacterial cellulose membrane as support for enzyme immobilization: Properties and morphological features. *Cellulose*, **27**(6), 3055–3083. DOI: 10.1007/s10570-020-02966-5
17. Wu, S.-C., Wu, S.-M., Su, F.-M. (2017) Novel process for immobilizing an enzyme on a bacterial cellulose membrane through repeated absorption. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **92**(1), 109–114. DOI: 10.1002/jctb.4994
18. Meister, A. (1955) Glutaminase, asparaginase, and  $\alpha$ -keto acid- $\omega$ -amidase. *Methods Enzymol.*, **2**, 380–385.

19. Krasotkina, J., Borisova, A.A., Gervaziev, Y.V., Sokolov, N.N. (2004) One-step purification and kinetic properties of the recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. Biotechnol. Appl. Biochem., **39**(2), 215–221. DOI: 10.1042/BA20030138
20. Bora, U., Kannan, K., Nahar, P. (2005) A simple method for functionalization of cellulose membrane for covalent immobilization of biomolecules. J. Membrane Sci., **250**(1–2), 215–222. DOI: 10.1016/j.memsci.2004.10.028
21. Cai, Q., Hu, C., Yang, N., Wang, Q., Wang, J., Pan, H., Hu, Y., Ruan, C. (2018) Enhanced activity and stability of industrial lipases immobilized onto spherelike bacterial cellulose. Int. J. Biol. Macromol., **109**, 1174–1181. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.100
22. Drozd, R., Szymańska, M., Rakoczy, R., Junka, A., Szymczyk, P., Fijałkowski, K. (2019) Functionalized magnetic bacterial cellulose beads as carrier for Lecitase® Ultra immobilization. Appl. Biochem. Biotechnol., **187**(1), 176–193. DOI: 10.1007/s12010-018-2816-1
23. Li, G., Nandgaonkar, A.G., Wang, Q., Zhang, J., Krause, W.E., Wei, Q., Lucia, L.A. (2017) Laccase-immobilized bacterial cellulose/TiO<sub>2</sub> functionalized composite membranes: Evaluation for photo- and bio-catalytic dye degradation. J. Membrane Sci., **525**(6), 89–98. DOI: 10.1016/j.memsci.2016.10.033
24. Li, J., Wan, Y., Li, L., Liang, H., Wang, J. (2009) Preparation and characterization of 2,3-dialdehyde bacterial cellulose for potential biodegradable tissue engineering scaffolds. Mater. Sci. Eng.: C, **29**(5), 1635–1642. DOI: 10.1016/j.msec.2009.01.006
25. Isobe, N., Lee, D.-S., Kwon, Y.-J., Kimura, S., Kuga, S., Wada, M., Kim, U.-J. (2011) Immobilization of protein on cellulose hydrogel. Cellulose, **18**(5), 1251–1256. DOI: 10.1007/s10570-011-9561-8
26. Kumari, S., Chauhan, G.S., Ahn, J.-H., Reddy, N.S. (2016) Bio-waste derived dialdehyde cellulose ethers as supports for  $\alpha$ -chymotrypsin immobilization. Int. J. Biol. Macromol., **85**, 227–237. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.12.063
27. Navapour, L., Mogharrab, N., Amininasab, M. (2014) How modification of accessible lysines to phenylalanine modulates the structural and functional properties of horseradish peroxidase: A simulation study. PLoS ONE, **9**(10), e109062. DOI: 10.1371/journal.pone.0109062
28. Kuchumova A.V. (2007) Pegilirovanie rekombinantnoj L-asparaginazy *Erwinia carotovora* s cel'yu usileniya ee terapevticheski znachimyh svojstv. Diss. kand. nauk, Institute of Biomedical Chemistry, Moscow.

Поступила: 27. 06. 2024.  
После доработки 16. 07. 2024.  
Принята к публикации: 30. 07. 2024.

## IMMOBILIZATION OF L-ASPARAGINASE ON OXIDIZED BACTERIAL CELLULOSE TO IMPROVE THE THERMAL STABILITY OF THE ENZYME

A.N. Shishparenok<sup>1\*</sup>, S.A. Koroleva<sup>2</sup>, I.D. Zlotnikov<sup>3</sup>, Yu.A. Gladilina<sup>1</sup>,  
M.V. Pokrovskaya<sup>1</sup>, S.S. Alexandrova<sup>1</sup>, D.D. Zhdanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: a.shishparyonok@yandex.ru

<sup>2</sup>Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University),  
6 Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198 Russia

<sup>3</sup>Moscow State University, 1 Leninskie Gory str., Moscow, 119192 Russia

Bacterial cellulose (BC) membranes can be modified for covalent immobilization of macromolecules. One type of modification is oxidation, after which the oxidized BC membrane (OBC) could be used as a matrix for covalent immobilization of enzymes. In this work, the BC membrane was chemically oxidized with sodium periodate (NaIO<sub>4</sub>) to increase the stability of immobilized mesophilic L-asparaginase (L-ASNase) from *Erwinia carotovora* (EwA). IR spectroscopy confirmed the immobilization of L-ASNase EwA on OBC membranes. Immobilization of the enzyme increased its temperature optimum for its activity by 15°C and raised the inactivation temperature to 60°C. The OBC membrane could be used as a potential carrier for covalent immobilization of enzymes to improve their pharmacological properties by increasing their thermostability.

**Key words:** L-asparaginase; bacterial cellulose; immobilization; thermal stability

### FUNDING

The work was conducted in accordance with framework of the Russian Federation fundamental research program for the long-term period (2021–2030) (No. 122022800499-5).

Received: 27.06.2024; revised: 16.07.2024; accepted: 30.07.2024.