Probl Cryobiol Cryomed 2023; 33(4):263–267
https://doi.org/10.15407/cryo33.04.263

УДК 57.086.13:577.15:547.458:544.77.022.822

І.П. Хала*, К.Д. Розанова, С.В. Рєпіна, О.А. Нардід

Низькотемпературний вплив на активність ферментів, вбудованих у альгінатні мікрокапсули

UDC 57.086.13:577.15:547.458:544.77.022.822

I.P. Khala*, K.D. Rozanova, S.V. Repina, O.A. Nardid

Low Temperature Influence on Activity in Alginate Microcapsules Incorporated-Enzymes

Ключові слова: каталаза, глюкозооксидаза, супероксиддисмутаза, заморожування-відігрівання, альгінатні мікрокапсули.
Key words: catalase, glucose oxidase, superoxide dismutase, freeze-warming, alginate microcapsules.

Ферменти широко застосовуються у багатьох біотехнологічних процесах [4, 8, 10]. Вони дуже чутливі до змін молекулярного оточення, яке значно відрізняється *in vivo* та *in vitro*, що може впливати на їхню функціональну активність. У медичній практиці основним шляхом стабілізації та підвищення біодоступності біологічно активних сполук є мікрокапсулювання в полімерні системи, наприклад, на основі альгінату натрію [1, 5]. При цьому фундаментальні дослідження таких складних систем, як гідрогелі з білковим вмістом, ускладнюються тим, що білки, зокрема ферменти, є гетерогенним класом біологічних макромолекул.

Для підвищення температурної стабільності ферментів та ефективності спрямованого транспорту в організмі, подовження терміну використання та посилення захисту від несприятливих умов навколишнього середовища були розроблені різні способи іммобілізації.

На сьогодні велика увага приділяється іммобілізації ферментів, яка ґрунтується на перевагах вбудованого у матриці на основі біосумісних полісахаридів ферменту порівняно з вільним ферментом, зокрема це стосується створення і застосування у медицині та інших галузях біоактивних гідрогелевих систем — навантажених каскадом ферментів біосумісних гідрогелевих носіїв [6]. Серед широкого класу ферментів виділяються супероксиддисмутаза (СОД), ка-

Enzymes are widely used in many biotechnological processes [4, 8, 10]. They are very sensitive to changes in the molecular environment, which is significantly different *in vivo* and *in vitro*, that can affect their functional activity. In medical practice, the main way to stabilize and increase the bioavailability of biologically active compounds is microencapsulation in polymer systems, for example, based on sodium alginate [1, 5]. At the same time, fundamental research of such complex systems as hydrogels with protein content is complicated by the fact that proteins, in particular enzymes, are a heterogeneous class of biological macromolecules.

Various ways of immobilization have been developed to enhance the temperature stability of enzymes and the efficiency of directed transport to a body, to extend the period of use and to strengthen protection against adverse environmental conditions.

Today, much attention is paid to enzyme immobilization, which is based on the advantages of an enzyme embedded in a matrix based on biocompatible polysaccharides compared to a free enzyme; in particular, it concerns the creation and use in medicine as well as other fields of bioactive hydrogel systems – biocompatible hydrogel carriers loaded with a cascade of enzymes [6]. Among a wide class of enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), which are the factors of

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: irynagor@gmail.com

Надійшла 31.07.2023
Прийнята до друку 08.11.2023

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

***To whom correspondence should be addressed:**
23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.:+380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: irynagor@gmail.com

Received 31, July, 2023
Accepted 08, November, 2023

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023
© Publisher Publishing House 'Akademperiodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

талаза (КАТ), які є факторами антиоксидантного захисту [2, 9], глюкозооксидаза (ГО), що може виконувати функцію природних нетоксичних окиснювачів цукрів [4]. На сьогодні продовжуються дослідження потенціального практичного використання таких ферментів [3, 4, 10]. Вбудовані у гідрогелеві мікроносії ферменти потребують довгострокового зберігання зі збереженням ферментативної активності, зокрема це може забезпечуватися низькими температурами.

Метою роботи було дослідження впливу заморожування-відігрівання та зберігання за температури –20°С на активність вбудованих у альгінатні мікрокапсули глобулярних білків-ферментів: супероксиддисмутази, каталази та глюкозооксидази.

У дослідженні використовували альгінат натрію низької в'язкості (2–4 сП); СОД, КАТ та ГО (Sigma-Aldrich Chemical, Німеччина).

Розчин альгінату натрію з ферментами готували наступним чином: 2 мл розчину ферменту в концентрації 1мг/мл змішували з 300 мкл 2%-го розчину альгінату натрію і доводили до 5 мл фосфатним буфером (рН=7,4). Після експозиції розчину протягом години одержували мікрокапсули методом іонотропного гелеутворення за методикою S.V. Narozhnyi та співавт. [6]. Для цього отриманий розчин додавали краплинно у ванну з 2%-м водним розчином $CaCl_2$. Мікросфери експонували в розчині $CaCl_2$ протягом години, далі їх відмивали від розчину $CaCl_2$ шляхом 3-хвилинного центрифугування при 1500g і поміщали у відповідний буфер для проведення подальших досліджень.

Концентрацію вбудованих ферментів визначали спектрофотометрично: вимірювали інтенсивність поглинання при довжині хвилі 280 нм, характерній для білка. За контроль приймали концентрацію вихідних розчинів. Активність СОД визначали за допомогою розчину адреналіну, активність КАТ — молібдату амонію [7]. Активність ГО вимірювали в 0,05 М фосфатному буфері (рН=7,4) з глюкозою у концентрації 1 мг/мл за накопиченням перекису водню, концентрацію якого визначали спектрофотометрично [4]. Усі спектри поглинання записували на спектрофотометрі «Pye Unicam SP 8000» (Pye Unicam Ltd, Велика Британія). Контролем вважали активність ферментів у вихідному розчині.

Для вивчення впливу заморожування та відігрівання на стан глобулярних білків-ферментів у складі альгінатних мікрокапсул останні замо-

antioxidant protection [2, 9], glucose oxidase (GOxx), which can perform the function of natural non-toxic oxidizers of sugars [4] are distinguished. Research into the potential practical use of such enzymes continues today [3, 4, 10]. Enzymes encapsulated in hydrogel microcarriers require long-term storage with preservation of enzymatic activity, in particular, this can be ensured by low temperatures.

The purpose of this research was to study the effect of freeze-warming and storage at a temperature of –20°C on the activity of globular proteins-enzymes encapsulated into alginate microcapsules: superoxide dismutase, catalase, and glucose oxidase.

Low viscosity sodium alginate (2–4 cP) was used in the study; SOD, CAT and GOx (Sigma-Aldrich Chemical, Germany).

Sodium alginate solution with enzymes was prepared as follows: 2 ml of enzyme solution at a concentration of 1 mg/ml was mixed with 300 μl of 2% sodium alginate solution and adjusted to 5 ml with phosphate buffer (pH=7.4). After exposing the solution for an hour, microcapsules were obtained by ionotropic gelation as reported by S.V. Narozhnyi *et al.* [6]. With this aim the resulted solution was added dropwise to a bath with a 2% aqueous solution of $CaCl_2$. Microspheres were exposed in $CaCl_2$ solution for an hour, and then they were washed from $CaCl_2$ solution by 3-min centrifugation at 1500g and placed in the appropriate buffer for further studies.

The concentration of encapsulated enzymes was examined spectrophotometrically: the intensity of absorption at a wavelength of 280 nm, characteristic of protein, was measured. The concentration of the original solutions was used as a control. COD activity was determined using an adrenaline solution, CAT activity using ammonium molybdate [7]. GOx activity was measured in 0.05 M phosphate buffer (pH=7.4) with glucose at a concentration of 1 mg/ml by the accumulation of hydrogen peroxide, the concentration of which was spectrophotometrically determined [6]. All absorption spectra were recorded with a Pye Unicam SP 8000 spectrophotometer (Pye Unicam Ltd, Great Britain). Enzyme activity in the original solution was considered as a control.

To study the effect of freeze-warming on the state of globular proteins-enzymes in alginate microcapsules, the latter were frozen to –20°C at a rate of 3–5 deg/min. It was then warmed in a water bath at 37°C or stored in a freezer for 18 months.

The obtained results were statistically processed using the 'Statgrap Hics Plus' version 2.1 for

рожували до –20°С зі швидкістю 3–5 град/хв. Далі відігрівали на водяній бані при 37°С або зберігали у морозильній камері впродовж 18 місяців.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою статистичного пакета програми «Statgrap Hics Plus» версія 2.1 for Windows (Manugistic, США). Дані на рисунках наведені як середнє значення ± стандартна помилка. Значущість відмінності результатів оцінювали за парним t-тестом при $p < 0,05$.

Оцінка ефективності вбудовування (концентрація вбудованого ферменту по відношенню до концентрації у вихідному розчині) показала, що всі досліджувані ферменти вбудовуються у альгінатні тривимірні мікроносії (рис. 1). Незначні відмінності цього показника можуть пояснюватися різними молекулярними масами та/або структурою ферменту. Активність вбудованих ферментів хоча і відрізняється, але знаходиться на достатньому (порівняно з вихідним розчином) рівні (рис. 2).

Заморожування-відігрівання альгінатних мікрокапсул із вбудованими ферментами призводило до часткового виходу білків (рис. 3). Кількість білка, який виходить, ймовірно обумовлений його молекулярною масою. Так, заморожування-відігрівання альгінатних мікрокапсул із СОД викликає значну втрату білка (46%), у той час як втрата КАТ є мінімальною. Молекулярна маса каталази складає 240 кДа і є най-

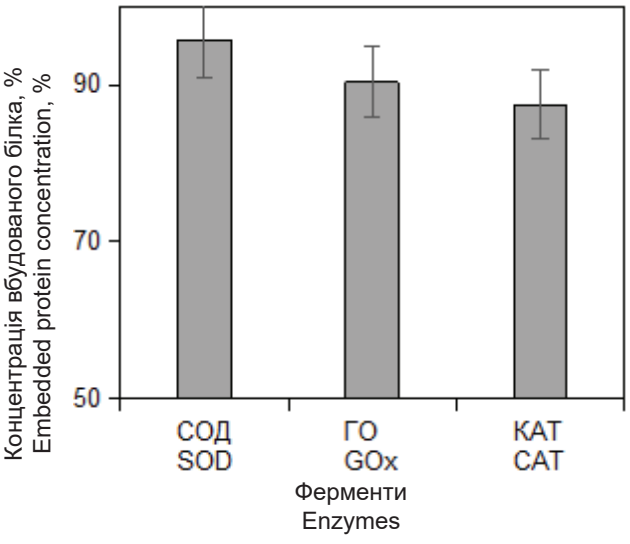

Рис. 1. Ефективність вбудовування ферментів у альгінатні капсули: СОД — супероксиддисмутаза, ГО — глюкозооксидаза, КАТ — каталаза.

Fig. 1. Effectiveness of enzymes encapsulated into alginate capsules: SOD – superoxide dismutase, GOx – glucose oxidase, CAT – catalase.

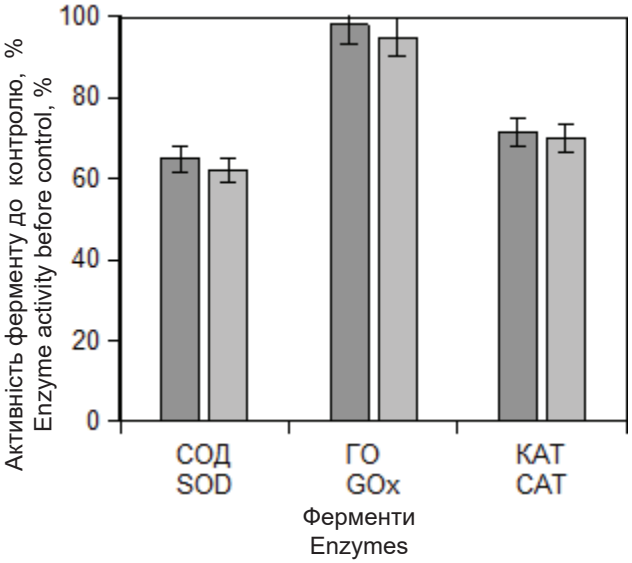

Рис. 2. Вплив низьких температур на активність ферменту, вбудованого у альгінатні мікрокапсули: ■ — до заморожування-відігрівання, ■ — після зберігання при –20°С.

Fig. 4. Influence of low temperatures on activity of the enzyme encapsulated in alginate microcapsules: ■ – before freeze-warming, ■ – after storage at –20°C.

Windows (Manugistic, USA). Data in figures are presented as mean ± standard error. The significance of the difference of the results was assessed in pairs t-test at $p < 0.05$.

Evaluation of the encapsulation efficiency (the concentration of encapsulated enzyme in relation to the concentration in original solution) showed that all the studied enzymes were incorporated into alginate three-dimensional microcarriers (Fig. 1). Minor differences (of this index) can be explained by different molecular weights and/or structure of the enzyme. The activity of the encapsulated enzymes, although different, is at a sufficient (compared to original solution) level (Fig. 2).

Freeze-warming of alginate microcapsules with encapsulated enzymes resulted in partial release of proteins (Fig. 3). The amount of protein that comes out is probably determined by its molecular weight. Thus, freeze-warming of alginate microcapsules with SOD causes a significant loss of protein (46%), while the loss of CAT is minimal. The molecular weight of catalase is 240 kDa and is the highest among the studied proteins, the output of catalase from microcapsules does not increase, even after their storage at –20°C for 18 months (see Fig. 2). Long-term storage of microcapsules with the addition of GOx at –20°C leads to significant (~2.5 times more) loss of protein (Fig. 3).

The activity of all enzymes that remained encapsulated into alginate microcapsules after

вищою серед вивчених білків, вихід КАТ із мікрокапсул не збільшується, навіть після їх зберігання при –20°С впродовж 18 місяців (див. рис. 2). Довгострокове зберігання мікрокапсул із додаванням ГО при –20°С призводить до значної (у ~ 2,5 рази більше) втрати білка (рис. 3).

Встановлено, що активність усіх ферментів, які залишилися вбудованими у альгінатні мікрокапсули після заморожування-відігрівання, зберігається (див. рис. 2) і значуще не змінюється після довгострокового зберігання за цієї температури.

Отже, вплив помірно низьких температур (–20°С) на мікрокапсули з вбудованими ферментами виявляється у частковому виході останніх, який може збільшуватися за довгострокового зберігання за цієї температури.

Шляхом для зниження виходу ферментів може бути модифікація альгінатних мікрокапсул іншими біосумісними речовинами, зокрема хітозаном.

Таким чином, результати проведених досліджень показали ефективність методу іонотропного гелеутворення для отримання альгінатних мікрокапсул із вбудованими ферментами (СОД, КАТ, ГО) з достатнім (порівняно з вихідним розчином) рівнем активності. Активність усіх ферментів, що залишилися вбудованими після низькотемпературного впливу, значуще не змінюється. Відмінності у вбудовуванні ферментів після зберігання за помірно низьких температур можуть пояснюватися різними їхніми молекулярними масами та/або структурою.

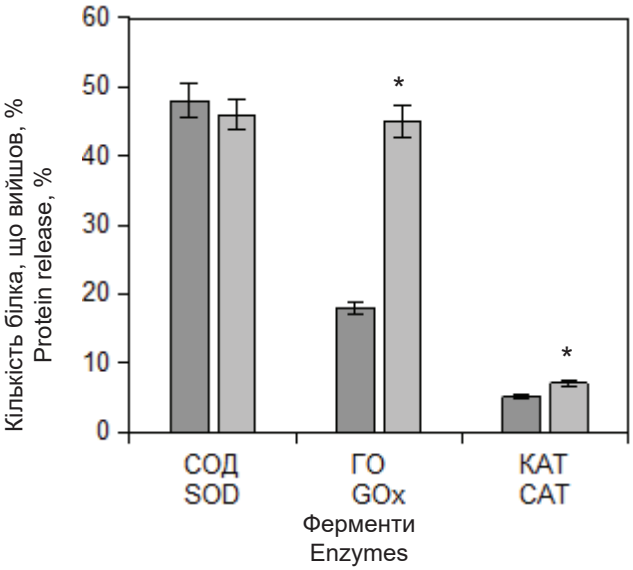

Рис. 3. Вплив низьких температур на вихід білка з альгінатних мікрокапсул: ■ — до заморожування-відігрівання, ■ — після зберігання при –20°С, * — відмінності значущі, $p < 0,05$.

Fig. 3. Effect of low temperatures on protein release from alginate microcapsules: ■ – before freeze-warming, ■ – after storage at –20°C, * – differences are significant, $p < 0.05$.

Література

1. Calvo TRA, Perullini M, Santagapita PR. Encapsulation of betacyanins and polyphenols extracted from leaves and stems of beetroot in Ca(II)-alginate beads: a structural study. J Food Eng. 2018; 235: 32–40.
2. Chang TMS. Artificial cell biotechnology for medical applications. Blood Purif. 2000; 18: 91–6.
3. Christofidou-Solomidou M, Muzykantov VR. Antioxidant strategies in respiratory medicine. Treat Respir Med. 2006; 5(1): 47–78.
4. Czyzewska K, Trusek A. Critical parameters in an enzymatic way to obtain the unsweet lactose-free milk using catalase and glucose oxidase co-encapsulated into hydrogel with chemical cross-linking. Foods [Internet]. 2023, Epub 26 Dec 2022 [cited 2022 Dec 26]; 12(1): 113. Available from: https://www.mdpi.com/2304-8158/12/1/113
5. Koshy ST, Zhang DKY, Grolman JM, et al. Injectable nanocomposite cryogels for versatile protein drug delivery. Acta Biomater. 2018; 65: 36–43.

freeze-warming was established to be kept (see Fig. 2) and did not significantly change after long-term storage at this temperature.

Therefore, the effect of moderately low temperatures (–20°C) on microcapsules with encapsulated enzymes is manifested in the partial yield of the latter, that can increase during long-term storage at this temperature.

Modification of alginate microcapsules with other biocompatible substances, in particular chitosan, can be a way to reduce the yield of enzymes.

Thus, the research results showed the effectiveness of the ionotropic gelation for obtaining alginate microcapsules with encapsulated enzymes (SOD, CAT, GOx) with a sufficient (compared to the original solution) activity level. The activity of all enzymes that remained encapsulated after low-temperature exposure did not change significantly. Differences in the incorporation of enzymes after storage at moderately low temperatures can be explained by their different molecular weights and/or structure.

References

1. Calvo TRA, Perullini M, Santagapita PR. Encapsulation of betacyanins and polyphenols extracted from leaves and stems of beetroot in Ca(II)-alginate beads: a structural study. J Food Eng. 2018; 235: 32–40.

6. Narozhnyi SV, RozanovaYeD, Nardid OA. [Effect of low temperature storage on proteins encapsulated in alginate microspheres]. Visnyk problem biologii i medytsyny. 2018; (2): 206–9. Russian.
7. Rozanova SL, Naumenko YI, Nardid EO. Influence of low temperature storage and ultrasonic treatment of placenta on its extracts antioxidant properties. Probl Cryobiol Cryomed. 2015; 25(3): 255–65.
8. Wang MI, Wang DI, Chen QI, et al. Recent advances in glucose-oxidase-based nanocomposites for tumor therapy. Small. [Internet]. 2019 Nov 20 [cited 2022 Now 20]; 1903895. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/smll.201903895
9. Yang H, Hu E, Matthews JL, et al. Is catalase an effective additive to alleviate oxidative stress during cryopreservation of zebrafish sperm at the repository level? Cryobiology. 2022; 104: 70–8.
10. Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. Int J Health Sci (Qassim). 2018; 12(3): 88–93.

2. Chang TMS. Artificial cell biotechnology for medical applications. Blood Purif. 2000; 18: 91–6.
3. Christofidou-Solomidou M, Muzykantov VR. Antioxidant strategies in respiratory medicine. Treat Respir Med. 2006; 5(1): 47–78.
4. Czyzewska K, Trusek A. Critical parameters in an enzymatic way to obtain the unsweet lactose-free milk using catalase and glucose oxidase co-encapsulated into hydrogel with chemical cross-linking. Foods [Internet]. 2023, Epub 26 Dec 2022 [cited 2022 Dec 26]; 12(1): 113. Available from: https://www.mdpi.com/2304-8158/12/1/113
5. Koshy ST, Zhang DKY, Grolman JM, et al. Injectable nanocomposite cryogels for versatile protein drug delivery. Acta Biomater. 2018; 65: 36–43.
6. Narozhnyi SV, Rozanova YeD, Nardid OA. [Effect of low temperature storage on proteins encapsulated in alginate microspheres]. Visnyk problem biologii i medytsyny. 2018; (2): 206–9. Russian.
7. Rozanova SL, Naumenko YI, Nardid EO. Influence of low temperature storage and ultrasonic treatment of placenta on its extracts antioxidant properties. Probl Cryobiol Cryomed. 2015; 25(3): 255–65.
8. Wang MI, Wang DI, Chen QI, et al. Recent advances in glucose-oxidase-based nanocomposites for tumor therapy. Small. [Internet]. 2019 Nov 20 [cited 2022 Now 20]; 1903895. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/smll.201903895
9. Yang H, Hu E, Matthews JL, et al. Is catalase an effective additive to alleviate oxidative stress during cryopreservation of zebrafish sperm at the repository level? Cryobiology. 2022; 104: 70–8.
10. Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. Int J Health Sci (Qassim). 2018; 12(3): 88–93.