

УДК 544.47:544.72

М.О.Ходыкина, Е.Д.Першина, К.А.Каздобин

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ *RAPHANUS SATIVUS L. VAR. NIGER* НА ВОДОНЕРАСТВОРИМЫХ ПОДЛОЖКАХ

При исследовании адсорбции ферментативного препарата *Raphanus sativus L. Var. niger* на подложки с различными кислотно-основными свойствами (бентонит и его кислотно модифицированная форма) показано, что при помощи управления электронной или протонной проводимостью подложки можно управлять редокс-активностью иммобилизованного фермента. Путем расчета на основе значений активного и реактивного сопротивлений на спектрах импеданса исследуемых систем возможна оценка влияния материала подложки на редокс-активность конечного композита и его стабильность во времени.

ВВЕДЕНИЕ. Одним из перспективных направлений развития экологического мониторинга является применение биокатализаторов — ферментов, поскольку большинство токсичных и физиологически активных веществ является либо их субстратами, либо эффекторами [1]. В частности, это пероксидазы растительного происхождения — наиболее изученные и доступные ферменты класса оксидоредуктаз, обладающие групповой субстратной специфичностью и высокой каталитической активностью [2]. Однако дальнейшее использование пероксидаз в химическом анализе ограничено низкой стабильностью и активностью нативного фермента в агрессивных и органических средах. Основной путь решения этой проблемы — переводение нативного биокатализатора в иммобилизованную форму [3, 4].

Ферментные электрохимические системы способны облегчать электронный транспорт благодаря собственной селективности и редокс-активности. Это связано с электроно- и протоноакцепторной способностью отдельных участков молекулы фермента [5]. Поэтому исследования механизмов электронного переноса между ферментом, подложкой и электродом играют не менее важную роль.

К основным показателям окислительной активности фермента относится изменение знака носителя заряда [6]. Предполагают, что редокс-активность системы, образовавшейся в результате иммобилизации фермента на носителе, зависит от реализации сопряженных взаимодействий и химического сродства фермента к подложке, определяющей прочность образуемого ком-

позита. Природа и знак носителя заряда исходных компонентов и образующейся композитной системы могут служить качественной и количественной оценкой направленной иммобилизации, позволяющей сохранять и регулировать суммарную редокс-активность электрохимической системы.

Цель работы — определение влияния природы подложки на стабильность образуемого композита в системах ферментативных препаратов на основе оксидоредуктаз.

ЭКСПЕРИМЕНТ И ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ. Объектом исследования был нативный и иммобилизованный на водонерастворимых подложках ферментативный препарат *Raphanus sativus L. Var. niger*, экстрагированный фосфатным буфером (рН 6.8) из измельченного растительного сырья [7]. Ферментный препарат иммобилизовали методом сорбции на бентоните (месторождение Дашуковка, Украина) и его кислотно модифицированной форме (слабощелочная и слабокислая подложка).

При измерении спектров импеданса использовали 0.5 %-ю суспензию исследуемых образцов. Для сравнения стабильности иммобилизованного фермента измерение повторяли на протяжении 3 дней при постоянной выдержке образцов в дистиллированной воде.

ИК-спектры ферментативного препарата, подложек и композитных материалов сняты на спектрофотометре Specord M80 (Karl Zeiss Jena, BRD).

Механизмы проводимости нативного ферментативного препарата и образцов, иммобилизованных на носителях, исследовали на основании анализа спектров электрохимического им-

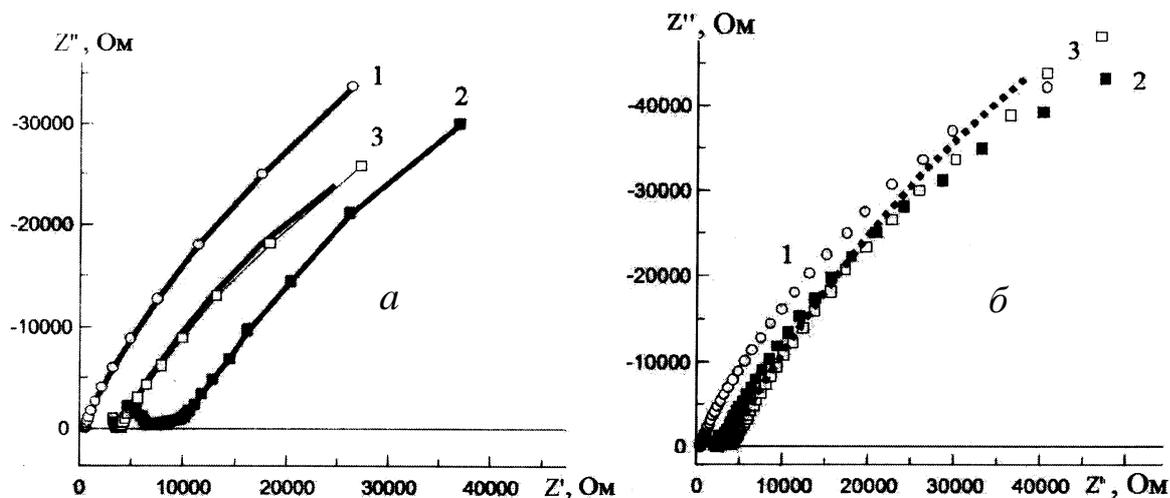


Рис. 1. Спектры импеданса 0.5 %-х суспензий пероксидазы, иммобилизованной на бентоните (а) и на модифицированном бентоните (б): 1 — исходный материал подложки; 2 — то же с адсорбированной пероксидазой на подложке; 3 — через 3 дня выдержки образцов в дистиллированной воде.

педанса 0.5 %-х водных суспензий нативного и иммобилизованного препаратов при $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Спектры импеданса снимали в двухэлектродной ячейке с платиновыми электродами площадью по 1 см^2 на расстоянии 1 см на электрохимическом модуле Autolab-30 модели PGSTAT 302N Metrohm Autolab, оснащенный модулем FRA (Frequency Response Analyzer) в интервале $10^{-2} - 10^6$ Гц. Модулем управляли при помощи программы Autolab 4.9 по стандартной процедуре с последующей обработкой в пакете Zview 2.0. Моделирование электрохимических реакций осуществляли по методу эквивалентных схем.

Известно, что наличие физической адсорбции полностью сохраняет активность фермента, поскольку молекула его не образует новых химических связей [8]. Для проверки характера адсорбции рассчитывали изменения знака носителя заряда, характеризующего стабильность проводящих свойств композита. В результате проведенных исследований установлено, что во всех полученных спектрах импеданса (рис. 1) наблюдается появление областей перегиба с нулевыми значениями реактивного сопротивления. Математический анализ, выполненный с учетом возможности изменения знака носителя заряда в таких точках, показал, что знак алгебраической суммы активного и реактивного сопротивления в спектрах импеданса в данном частотном диапазоне соответствует знаку носителя тока, то есть преобладает протонная или электронная про-

димность. Данный вывод находится в соответствии с кинетикой изменения pH фермента и наличием двух областей потенциалов изоэлектрического сдвига, а также соответствует строению ферментов оксидоредуктазного типа, имеющих группы NH^+ и OH^- , которые управляют суммарной редокс-активностью.

Для проверки полученных выводов и определения влияния структурных особенностей минеральной подложки на стабильность редокс-активности иммобилизованного фермента рассмотрены ИК-спектры исследованных подложек и композитов на их основе (рис. 2, 3).

Результаты ИК-исследований симбатны по-

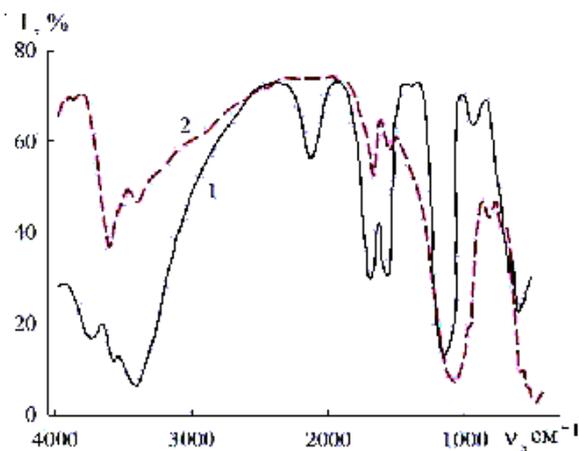


Рис. 2. ИК-спектры пероксидазы, иммобилизованной на бентоните: 1 — исходный бентонит; 2 — композит.

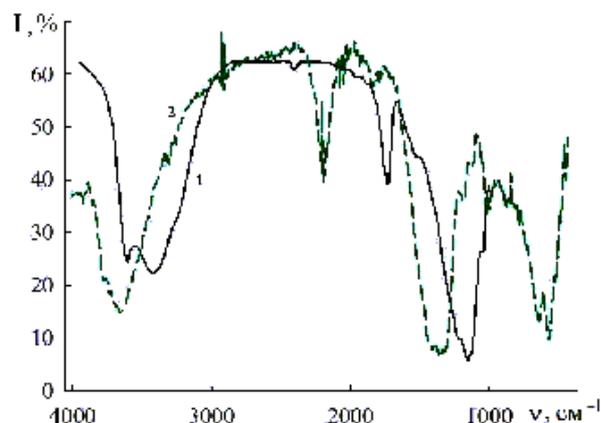


Рис. 3. ИК-спектры пероксидазы, иммобилизованной на модифицированном фосфат-ионами бентоните: 1 — модифицированный фосфат-ионами бентонит; 2 — композит.

Динамика инактивации нативной и иммобилизованной пероксидазы *Raphanus sativus L. Var. niger*

Система	$\Delta A, \%$	$\Delta t, \text{сут}$	$w = \Delta A / \Delta t, \%$ $\%/\text{сут}$
Нативный препарат	50	0.08 (2 ч)	625
Иммобилизованный на бентоните	10	14	0.7
Иммобилизованный на фосфатированном бентоните	14	210	0.007

лученным при анализе спектров импеданса по предлагаемой методике. Так, при иммобилизации фермента на бентоните идентифицированы все наиболее характерные для минерала полосы поглощения. Полосы поглощения с максимумами 470, 1040 обусловлены колебаниями Si—O-связей; 525 — Si—O—Al; колебания OH- групп проявляются в виде полос поглощения в областях 1600—3200 и 3200—4000 см^{-1} [9].

Максимальную стабильность во времени показала подложка из модифицированного фосфат-ионами бентонита. Однако относительно исходного природного минерала наблюдается смещение пика адсорбированной воды в более длинноволновую область, а проявление структурных OH-групп — в более коротковолновую область, что в сумме снижает волновой диапазон в 1.5 раза. Следовательно, возможно снижение энергетического барьера при образовании водородных связей между OH-группами и водой или OH-группами и полярными группами фермента, что должно приводить к более стабильной

редокс-активности композита.

Анализ спектров импеданса и ИК-спектров позволил предположить консервирующее действие подложки на иммобилизованный ферментный препарат с последующей его активацией в водной среде. Это нашло подтверждение в экспериментах по исследованию окислительной активности систем (ΔA , изменение активности, таблица).

ВЫВОДЫ. Применяя водонерастворимые подложки (бентонит и его кислотно модифицированная форма) с преимущественно электронной или протонной проводимостью, можно управлять редокс-активностью иммобилизованного нативного ферментного препарата. С помощью расчетного метода на основе использования значений активного и реактивного сопро-

тивлений на спектрах импеданса исследуемых систем возможна оценка влияния материала подложки на редокс-активность конечного композита и его стабильность во времени. Наличие высоких положительных значений приводит к инициации электронной проводимости иммобилизованного фермента. Обратное влияние оказывает подложка, обладающая высоким отрицательным значением, то есть высокой протонной проводимостью. Стабильность работы композита зависит от вида адсорбции фермента и наличия конкурирующей адсорбции воды.

РЕЗЮМЕ. При дослідженні адсорбції ферментативного препарату *Raphanus sativus L. Var. niger* на підкладки з різними кислотно-основними властивостями (бентоніт і його кислотно модифікована форма) показано, що за допомогою керування електронною або протонною провідністю підкладки можна управляти редокс-активністю іммобілізованого нативного ферменту. Шляхом розрахунку на основі значень активного і реактивного опорів на спектрах імпедансу досліджуваних систем можлива оцінка впливу матеріалу підкладки на редокс-активність кінцевого композиту і його стабільність у часі.

SUMMARY. On studies of the adsorption of the enzyme composition of *Raphanus sativus L. Var. niger* on substrates with different acid-base properties (bentonite

and its acid modified form) it was shown that by controlling electron or proton conductivity of the substrate the redox-activity of the immobilized native enzyme could be controlled. By the calculations based on the values of active resistance and reactance of the impedance spectra of studied systems the influence of the substrate material on the redox-activity of the final composite was shown as well as the possibility of the estimation of its stability in time.

ЛИТЕРАТУРА

1. Singh R.K., Tiwari M.K., Singh R., Lee J.-K. // *Int. J. Mol. Sci.* -2013.-14. -P. 1232—1277.
2. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. -М.: ГИАРД, 2004.
3. Fornera S., Balmer T.E., Baozhong Zhang et al. // *Macromol. Biosci.* -2011. -**11**. -P. 1052—1067.
4. Захарова Г.С., Упоров И.В., Тишков В. И. // *Успехи биолог. химии.* -2011. -**51**. -С. 37—64.
5. Nekrasova V.K. // *Bioelectrochem. and Bioenergetics.* -1975. -**2**, № 1. -P. 43—51.
6. Каздобин К.А., Першина Е.Д., Ходыкина М.О., Коханенко В.В. // Тези доп. XIX Укр. конф. з неорган. хімії. -Одеса, 7–11.09.2014.
7. *Methods of Biochemical Analysis.* Vol. 1 / Ed. D.Glick. -New-York; London: Interscience Publ. Inc., 1954. -P. 357—425.
8. *Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы /* Под ред. Дж.Вудворда. -М.: Мир, 1988.
9. Тарасевич Ю.И. // *Укр. хим. журн.* -1968. -**34**, № 5. -С. 439—446.

Институт общей и неорганической химии
им. В.И.Вернадского НАН Украины, Киев

Поступила 25.11.2014