

несколько выше, чем следовало бы ожидать по их силе оснований в бензиловом спирте, что, по-видимому, связано с существованием определенной доли  $\pi$  – дативного взаимодействия, увеличивающего прочность связи лиганда с металлом. Это согласуется с данными по устойчивости комплексов в бензиловом спирте.

Для комплексов меди (II) с первичными аминами наблюдается корреляция между  $pK_n$  комплексов в бензиловом спирте и их теплотами разложения.

**Выводы.** Термическая диссоциация комплексов меди (II) с первичными аминами, в основном, протекает в две стадии. На первой происходит отщепление одной молекулы лиганда, на второй стадии – второй молекулы. Со вторичными аминами процесс несколько отличается от термического разложения комплексов с первичными аминами. Наблюдается дробное отщепление лигандов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Антипова-Каратаева И.И. Исследование комплексов в растворах с помощью спектров поглощения в видимой и ультрафиолетовой областях / Антипова-Каратаева И.И. // В кн.: Современные методы анализа. Методы исследования химического состава и строения вещества. – М.: Наука, 1965. – С.107-122.
2. Сергеева В.Ф. Спектрофотометрическое изучение растворов хлорной меди / Сергеева В.Ф., Дементьев В.С. // Журнал неорганической химии. – 1960. – №7, т.5. – С.1601-1604.
3. Калиниченко Л.Т. Исследование комплексообразования хлорида и нитрата меди (II) с пиридином и его производными: дис. ... канд. хим. наук.: 02.00.01 / Калиниченко Л.Т. – Днепропетровск, 1979. – 227с.
4. Климова В.А. Основные микрометоды анализа органических соединений / Климова В.А. – М.: Химия, 1975. – 224с.
5. Гиллебранд В.Ф. Практическое руководство по неорганическому анализу / Гиллебранд В.Ф., Лендель Г.Э., Гофман Д.И. – М.: Химия, 1966. – 1111с.
6. Шарло Г. Методы аналитической химии. Качественный анализ неорганических соединений. Ч. 1 / Шарло Г. – 2-е изд., испрл. и доп. – М.: Химия, 1969. – 667с.

*Поступила в редколлегию 05.06.2013.*

УДК 681.3:65.014.1

ГУЛЯЄВ В.М., д.т.н., професор  
КОРНІЄНКО І.М., к.т.н., доцент  
РАДЧЕНКО О.С., бакалавр  
СТАСЮК Ю.О., бакалавр

Дніпродзержинський державний технічний університет

### **ДОСЛІДЖЕННЯ МЕТОДИКИ ВИДІЛЕННЯ РОСЛИННОГО ФЕРМЕНТУ ПЕРОКСИДАЗИ З МЕТОЮ СТВОРЕННЯ КОНТРОЛЬНО-ВИМІРЮВАЛЬНОГО ПРИЛАДУ (БІОСЕНСОРУ)**

**Вступ.** Відомо, що ферменти – це біологічні каталізатори, що володіють яскраво вираженою здатністю вибірково каталізувати багато хімічних перетворень як в живій клітині, так і поза організмом. Перша згадка про аналітичні пристрої на основі ферментів з'явилася порівняно нещодавно, в 60-х роках нашого століття. Потім у побут увійшло поняття "біосенсиори" або "біочип".

Властивості ферментів давно привертала увагу дослідників, у тому числі і аналітиків, але практичному застосуванню ферментів, наприклад, для аналітичних цілей перешкождали насамперед мала доступність чистих ферментів, нестійкість у часі їх роз-

чинів, неможливість багаторазового використання однієї порції ферменту через складність відділення його від інших компонентів розчину, висока вартість очищених препаратів. Однак вихід з положення незабаром був знайдений, і з'явилася можливість використання каталітичних властивостей ферментів поза живим організмом і можливість збереження цієї здатності протягом тривалого часу практично без зміни. Досягнення в цій області біохімії та ензимології дали початок розвитку нового напрямку – безреагентних методів аналізу, заснованих на використанні різних біохімічних сенсорів в якості діагностикумів.

Біосенсори знаходять все більш широке застосування у промисловості, сільському господарстві, медицині, оскільки дозволяють швидко і якісно аналізувати складні, багатокомпонентні суміші речовин. Розробка біосенсорів – аналітичних пристроїв нового покоління – є одним із перспективних напрямків в області біотехніки [1].

Будь-який біосенсор складається із двох принципових функціональних елементів: біоселектуючої мембрани, що використовує різні біологічні структури, і фізичного перетворювача сигналу (трансд'юсера), що трансформує концентраційний сигнал в електричний. Для зчитування й запису інформації використовують електронні системи посилення й реєстрації сигналу. У якості біоселектуючого матеріалу використовують всі типи біологічних структур: ферменти, антитіла, рецептори, нуклеїнові кислоти й навіть живі клітини. Трансд'юсерами можуть бути електрохімічні перетворювачі (електроди), різного роду оптичні перетворювачі, гравітаційні, калориметричні, резонансні системи. Всі види біоселектуючих елементів можна комбінувати з різними трансд'юсерами. Це створить велику різноманітність різних типів біосенсорів.

Унікальними особливостями біосенсорів, на відміну від хімічних датчиків, є мініатюрність (мікронні розміри), висока здатність здійснювати впізнавання без додаткових витрат енергії (підвищення температури, накладення потенціалу і т.д.), висока чутливість (до 10-18 М) та специфічність, яка визначається використанням біоматеріалу, інтеграція зі схеми обробки сигналу на одному кристалі, малий час відліку та можливість створення мікромультидатчиків [2].

**Постановка задачі.** Метою даної роботи є виділення ферменту-пероксидази з послідовним порівнянням її активності у різних рослинних об'єктах. У якості дослідних зразків було використано листя моркви, огірка та коріння редьки.

Для виявлення пероксидази в представленій методиці запропоновано використовувати гідрохінон, який під її дією окислюється в хінон.

Хінон з надлишком гідрохінону дає подвійне з'єднання – хінгідрон, що випадає у вигляді темно-фіолетових голок більшої чи меншої довжини. Потемніння розчину гідрохінону і випадання темних голок у присутності водню пероксиду і витяжки з рослинних тканин указує на його окислення пероксидазою.

Для виявлення пероксидази використовують також гваякол, який окислюється пероксидазою в присутності водню пероксиду з утворенням забарвлених сполук.

Гваякол (Guajacolum) – це монометилловий ефір брэнцкатехіпа. Гваякол є головною складовою частиною креозоту, з якого і виходить шляхом повторної фракційної перегонки. Гваякол має вигляд безбарвних або жовтуватих кристалів, що плавляться при температурі 28,5°C, або прозорої маслоподібної рідини ароматичного запаху. Температура кипіння гваякола дорівнює 200-205°C. Він легко розчиняється у спирті, ефірі та жирних оліях.

Матеріали та обладнання для одержання витяжок: 5%-й розчин гідрохінону, 1%-й розчин гваякола, 3%-й розчин пероксиду водню (готуємо з 30%-го пергідролу у день визначення), рослинний матеріал, центрифуга, водяна баня, пробірки, лійки, ступки з товкачем, піпетки, вата, марля.

Приготування ферментативних витяжок:

1. Листя моркви розтираємо у ступці, доливаємо 15 мл води і відстоюємо 5-7 хвилин. Надосадову рідину зливаємо в чисту суху пробірку і використовуємо для дослідів.

2. Листя огірка розтираємо у ступці. Надосадову рідину зливаємо в чисту суху пробірку і використовуємо для аналізу.

3. Для отримання екстракту із коренів редьки взято екстрагент – 10%-й розчин етилового спирту ( $C_2H_5OH$ ) та наважку коренів редьки.

Наважку подрібнених коренів редьки в кількості 5г розтираємо в ступці з екстрагентом – 10%-м розчином  $C_2H_5OH$  (в якості екстрагенту також можна було використати і бідистильовану воду), відділяємо екстракт від сировини, розбавляємо до 50 мл та настоюємо протягом 30 хв.

Для отримання соку із коренів редьки взято подрібнені корені редьки і марля, складена вчетверо. Сік було віджато вручну, шляхом віджимання марлі, в яку загорнуто подрібнені корені редьки. Сік має коричневий колір та специфічний запах.

*Дослід № 1.* У дві пробірки вносили по 2 мл підготовленої витяжки. В одній пробірці витяжку кип'ятили, а потім охолоджували до кімнатної температури. Третю пробірку заповнювали 2 мл води (контроль).

До кожної пробірки доливали 1 мл гідрохінону і по 3 краплі пероксиду водню. Вміст пробірок перемішували і відправляли до водяної бані, витримуючи вміст при температурі 30°C.

*Дослід № 2.* Готували, як описано вище. У кожен пробірку доливали по 1 мл 1%-го розчину гваякола і по 3 краплі пероксиду водню. Пробірки струшували з метою перемішування вмісту і нагрівали на водяній бані до температури 30°C.

*Дослід № 3.* Це дослідження полягало в приготуванні підложки для іммобілізації екстракту та соку із коренів редьки. У досліді було використано метод іммобілізації – включення в гель. Суть цього методу полягає у включенні ферментів в гель плівки альбуміну, желатину, колагену, агар-агару та гідроксиду алюмінію. В якості оптимального засобу іммобілізації було використано желатин, який є легко доступним і дешевим. Потім плівка прикріплюється до поверхні електроду.

Для приготування підложки було взято наважку желатину 3 г, яку засипано в колбу. В колбу вносили 100 мл дистильованої води, з наступним нагріванням та перемішуванням до повного розчинення желатину. Готовий розчин іммобілізатору охолоджували до температури 30°C, розподіляючи його на 2 скляночки, в яких відбувається іммобілізація. В першу скляночку вносили 1 мл екстракту із коренів редьки, а в другу – 1 мл соку із коренів редьки, перемішуючи вміст обох скляночок з наступним охолодженням до утворення гелю.

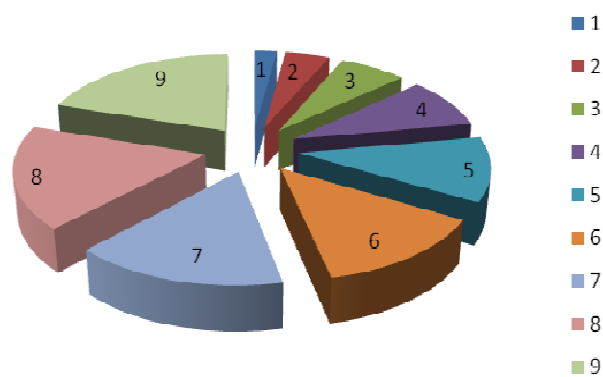
*Дослід № 4.* Виготовлення біосенсора на основі скляного електроду рН-метру.

За основу біосенсора взято звичайний скляний електрод. Принцип дії скляного електроду заснований на тому, що між тонкою скляною стінкою і водним розчином виникає різниця потенціалів, величина якої залежить від концентрації водневих іонів розчину. На скляний електрод і наносили гель з іммобілізованим ферментом. Спочатку був нанесений гель з іммобілізованим екстрактом, а потім – з іммобілізованим соком редьки [3].

**Результати роботи.** На базі проведених дослідів було виконано вимірювання пероксидазної активності у листі моркви та огірка, результати яких відображено у вигляді діаграм на рис.1 та 2 відповідно.

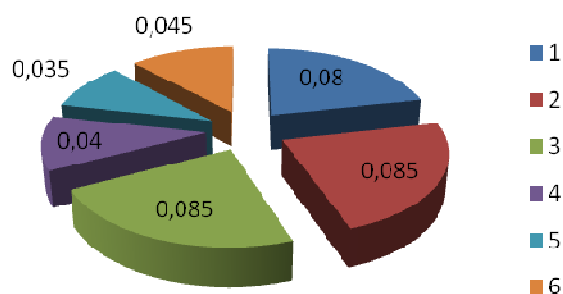
Порівнюючи результати вимірів пероксидазної активності (рис.1, 2), встановлено, що більш високий рівень ферментативної активності спостерігається у листя стійких сортів моркви. Коефіцієнт кореляції в даному випадку становить 0,88.

Аналіз значень базового рівня пероксидазної активності у листі огірка показав наявність позитивної кореляції між стійкістю і ферментативною активністю. Коефіцієнт кореляції в даному випадку дорівнює 0,86.



1 – Червоний велетень – 0,4; 2 – Шантане – 0,37;  
3 – Московська зимова – 0,25;  
4 – Королева осені – 0,31;  
5 – Лосінострівська – 0,23; 6 – Павліна – 0,28;  
7 – Левоніха – 0,22; 8 – Карпена – 0,15;  
9 – Амстердамська – 0,18

Рисунок 1 – Розподіл пероксидазної активності у листі моркви відносно популярних сортів, нмоль/мг ферменту за хвилину



1 – Верасень – 0,08; 2 – Вяселка – 0,085;  
3 – Зарниця – 0,085; 4 – Світанок – 0,04;  
5 – Корал – 0,035; 6 – Янус – 0,045

Рисунок 2 – Розподіл пероксидазної активності у листі огірка відносно популярних сортів, нмоль/мг ферменту за хвилину

Результати вимірювань (дослід №3 та №4) чутливості біосенсора з іммобілізованим екстрактом наведено в табл.1 та на рис.3.

Таблиця 1 – Значення рН при взаємодії біосенсора з іммобілізованим соком редьки з розчинами  $H_2O_2$

Концентрація $H_2O_2$ , г/мл $\cdot 10^{-3}$	рН
30	7,5
3	7,7
0,3	7,8
0,03	7,9
0,003	8,1

З табл.1 видно, що біосенсор з іммобілізованим соком досить чутливий до малих концентрацій перекису водню, що свідчить про його високу активність.

Було проведено додаткові контрольні заміри і створено біосенсори з більшим вмістом іммобілізованого матеріалу.

З рис.3 видно, що біосенсор на основі іммобілізованого соку редьки виявився більш чутливим до малих концентрацій  $H_2O_2$ , ніж біосенсор на основі іммобілізованого екстракту.

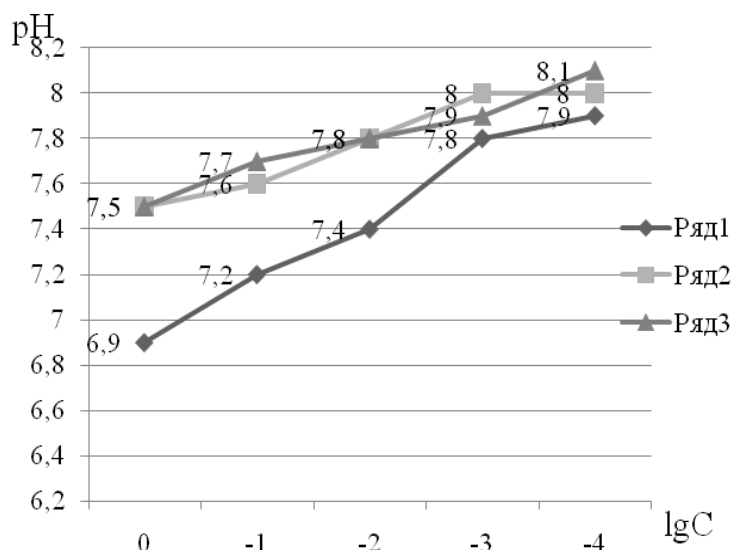
Для контрольних біосенсорів було взято по 3 мл соку редьки та екстракту. Для контрольного заміру був узятий нерозбавлений розчин аптечного перекису водню концентрацією 0,03 г/мл, рН = 6,2.

Було отримано наступні результати:

- біосенсор з іммобілізованим екстрактом – рН = 6,6;
- біосенсор з іммобілізованим соком редьки – рН = 6,7.

**Висновки.** Показано актуальність використання чутливих біосенсорів на основі рослинних ферментів як одного з найефективніших контрольно-вимірювальних приладів ферментативної активності.

За допомогою розробленого біосенсора на основі скляного електроду рН метру з



- Ряд 1 – залежність рН водню пероксиду від його концентрації;
- Ряд 2 – значення рН після занурення в розчини водню біосенсора з іммобілізованим екстрактом;
- Ряд 3 – значення рН після занурення в розчини водню біосенсора з іммобілізованим соком редьки

Рисунок 3 – Результати досліджень залежності концентрації водневих іонів до і після контакту з біосенсорами

іммобілізованим ферментом визначено пероксидазну активність в листі моркви і огірка, яка впливає на термін зберігання та реалізації зазначених овочів. Найбільш оптимальним для сільськогосподарського вирощування визначено такі сорти моркви як Червоний Велетень та Шантане, тому що пероксидазна активність для цих сортів становить 0,4 та 0,37 нмоль/мг відповідно.

Найбільш цінним з аграрної точки зору є сорти Веселка та Зарниця, тому що величина пероксидазної активності для них становить 0,085 нмоль/мг, що удвічі є більшою, ніж у сортів Корал, Янус та Світанок.

Розроблено та досліджено власноруч підложку для іммобілізації з екстракту та соку редьки шляхом включення в гель. Встановлено, що розроблений біосенсор на основі іммобілізованого соку редьки є більш чутливим щодо визначення пероксидазної активності в сільськогосподарських культурах, ніж з іммобілізованим екстрактом. Оптимальним значенням рН для цих визначень можна вважати межу 6,6-6,7.

Зроблено висновок про доцільність масового вирощування тих сортів рослин, котрі володіють найбільшою пероксидазною активністю.

У біосенсорних пристроях пероксидаза редьки зберігає свої переваги, бо є компонентом сполучених ферментних систем і може використовуватися у якості мітки біорозпізнавального елемента.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений / В.А.Андреева. – М.: Наука, 1988. – 128с.
2. Будников Г.К. Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикророзэлектродами / Будников Г.К., Майстренко В.Н., Муринов Ю.И. – М.: Наука, 1994. – 238с.
3. Биосенсоры: основы и приложения / [под ред. Э.Тернера и др.]. – М.: Мир, 1992. – 614с.

Надійшла до редколегії 19.11.2013.