

найти применение в молекулярной электронике при разработке новых материалов (органические люминофоры, температурные датчики и т.п.).

Авторы выражают благодарность ГПНИ «Электроника и фотоника», задание 2.3.03 за финансовую поддержку.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ

Кудряшов А.П.

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
kudrant@mail.ru*

Иммобилизованные ферменты давно привлекают внимание ученых и технологов [1]. Иммобилизация позволяет упростить технологические процессы и обеспечить многократное использование фермента. Пероксидаза (Пх) относительно стабильна и недорога, а ее свойства хорошо изучены, поэтому фермент весьма подходит для использования в учебном процессе при изучении биосенсоров. Цель работы состояла в исследовании характеристик препаратов иммобилизованной пероксидазы, получаемых различными способами, при их хранении в воде.

Для приготовления препаратов иммобилизованной пероксидазы использовался реактив «пероксидаза из хрена» (Reanal, Венгрия). Определение активности Пх производилось с помощью бензидина (БД) по методике [2] с модификацией. Модификация касалась только вычислительных процедур, позволяющих получать числовые значения удельной активности препаратов фермента. Кинетика процесса окисления БД отслеживалась с помощью спектрофотометра Cary 50. Измерения проводились при температуре 23 ± 2 °С. Иммобилизацию Пх осуществлялись путем включения ее в гели или сшивкой фермента с носителем (целлофан) с помощью глутарового диальдегида (ГДА). В результате, были получены 4 разных препарата на основе гелей агар-агара (ААП), альгината кальция (АП), полиакриламида (ПАП) и целлофана (ЦП), для приготовления которых использовался базовый раствор (2 %) Пх (БРП) в объеме 1 мл.

Все препараты иммобилизованной пероксидазы (навески по 100 мг, или 4 листочка ЦП размером 1x1 см) хранились в закрытых стеклянных флаконах с дистиллированной водой (5 мл) в холодильнике при температуре 7 ± 3 °С. Ежедневно вода из флаконов полностью извлекалась, вынималось и содержимое части флаконов для анализа на пероксидазную

активность (ПА). Эти флаконы в дальнейшем не использовались, а остальные заполнялись 5 мл дистиллированной воды.

Оценка суммарной активности пероксидазы, включенной в гели, и сопоставление этих величин с исходной активностью БРП продемонстрировала что, при получении гелевых препаратов нет заметной инактивации фермента, а вводимая в гель Пх почти полностью сохраняла каталитические свойства. Однако ЦП в заметно меньшей степени, чем другие препараты катализировал процесс окисления ДБ. Несложно подсчитать по суммарной активности ЦП, что из БРП на носитель перешло не более 16 % фермента. По-видимому, заметной инактивации Пх при получении ЦП нет, поскольку отсутствовали изменения активности БРП в процессе иммобилизации Пх на целлофане.

Таблица 1 – Некоторые характеристики препаратов иммобилизованной пероксидазы (ПИП) сразу же после их получения

Параметр	Препарат пероксидазы				
	БРП	ААП	АП	ПАП	ЦП
Удельная активность	15,0±2,5	4,9±0,8	3,8±0,7	2,4±0,5	0,06±0,01
Размерность	$\frac{\text{мкмоль БД}}{\text{мин}\cdot\text{мл}}$	$\frac{\text{мкмоль БД}}{\text{мин}\cdot\text{г}}$	$\frac{\text{мкмоль БД}}{\text{мин}\cdot\text{г}}$	$\frac{\text{мкмоль БД}}{\text{мин}\cdot\text{г}}$	$\frac{\text{мкмоль БД}}{\text{мин}\cdot\text{см}^2}$
Суммарная активность Пх в препарате, % от вводимой	100	98±5	95±6	94±4	16±3

Хотя не было строгого соблюдения правил асептики, полученные препараты проявляли пероксидазную активность и по истечении 4 недель хранения. Однако при хранении препаратов отмечалось снижение ПА. Характер зависимости удельной активности препаратов от времени их хранения удовлетворительно описывается функцией вида $f = \exp(-\lambda t)$, где λ – постоянная времени процесса снижения активности, а t – время хранения. Значение λ для ПАП и ААП одинаково и равно $0,094 \text{ сут}^{-1}$, а у АГ – $0,125 \text{ сут}^{-1}$. Функцией f могут быть описаны и процессы уменьшения содержания вещества в геле за счет его перехода в среду. Это предположение кажется вероятным, поскольку нами показано, что в воде из флаконов с навесками препаратов обнаруживается ПА. Кроме того, потери ПА препаратами за 7 сут их хранения вполне сопоставимы с регистрируемой ПА среды, а наибольшая активность отмечается в воде из

флакона с АП, для которого отмечено максимальное снижение ПА (табл. 2).

Гранулы ААП и ПАП одинаковы по форме и размерам, а у АП эти параметры иные (сферические и в 1,5–2 раза крупнее), поэтому возможно, что различия в характеристиках процесса вымывания Пх из препаратов обусловлены этими факторами. При практическом использовании препаратов иммобилизованной Пх размеры, и форма иммобилизованного биокатализатора будут иными. Переход Пх из геля в воду обусловлен диффузией и приемлемо уравнение:

$$dA/dt = S \cdot P_{г-в} (C_г^e - C_в^e) \quad (1)$$

где A – количество Пх, перешедшей из геля в воду; t – время хранения препарата; S – площадь поверхности контакта геля и воды; $P_{г-в}$ – коэффициент перехода Пх между фазами; $C_г^e$ и $C_в^e$ – концентрации Пх на границе фаз в геле и воде соответственно.

Таблица 2 – Динамика изменения пероксидазной активности препаратов иммобилизованной пероксидазы и среды в % от начальной активности

Время инкубации, сут	Препарат иммобилизованной пероксидазы							
	ААП		ПАП		АП		ЦП	
	ААП	среда	ПАП	среда	АП	среда	ЦП	среда
0	100	0	100	0	100	0	100	0
7	45±6	58±7	45±6	55±5	35±4	68±7	95±9	10±4
14	28±4	13±3	26±3	17±3	17±4	14±2	90±7	0
21	17±3	12±2	19±7	10±2	7±2	12±3	-	-
30	6±1	10±2	4±1	7±1	4±2	6±1	-	-

При предположении, что в геле Пх постоянно распределена равномерно и всегда $C_г^e \gg C_в^e$ уравнение (1) преобразуется к виду:

$$-dC_г/dt = P_{г-в} C_г S/V \quad (2)$$

где V – объем геля. Решение уравнения (2) позволяет получить зависимость, отражающую динамику содержания Пх в геле ($C_г$):

$$C_г = C_г^0 \exp(-S \cdot P_{г-в} t / V) \quad (3)$$

где $C_г^0$ – начальная концентрация Пх в геле. Уравнение (3) идентично функции, используемой для аппроксимации экспериментальных данных, а λ определяется величинами S , $P_{г-в}$ и V . Форма и размеры гранул препарата АП отличаются от ПАП и ААП, но объемы одинаковы. Согласно расчетам S/V для АП почти в 2 раза меньше, чем у ПАП и ААП, т. е. причина более быстрого снижения ПА у АП состоит не в размерах и форме гранул, а в степени удержания Пх гелем альгината кальция.

Следует отметить, что ЦП оказался наиболее стабильным из препаратов Пх. Тем не менее, он и использованная технология иммобилизации мало пригодны для практического применения, т. к. ПА ЦП низка и не очевиден способ ее повышения. Напротив, на основе гелей возможно получать препараты иммобилизованной пероксидазы с заданной активностью, а их хранение осуществлять при 100 % влажности.

Литература

1. Введение в прикладную энзимологию. Иммобилизованные ферменты. /под. ред. Березина И.В. и Мартиника К. М. МГУ. – 1982. – 382 с.
2. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. М. Высшая школа. – 1975. – 392 с.

КАТАЛИЗ ПАРАЦЕТАМОЛОМ И ТИРОЗИНОМ ОКИСЛЕНИЯ ТИАМИНА, ПРОТЕКАЮЩЕГО ПОД ДЕЙСТВИЕМ МЕТМИОГЛОБИНА ИЛИ МЕТГЕМОГЛОБИНА И ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

Лабор С.А.¹, Опарин А.Ю.¹, Степура В.И.², Степура И.И.¹,
Пархоменко Ю.М.³, Донченко Г.В.³

¹*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Гродно (филиал)
biophys@biochem.unibel.by*

²*Гродненский госуниверситет им. Янки Купалы, Гродно, Беларусь*

³*Институт биохимии им. А.В.Палладина НАН Украины, Киев, Украина*

Гем содержащие белки гемоглобин (Hb) и миоглобин (Mb) обратимо связывают молекулярный кислород. Hb обеспечивает транспорт кислорода во все части организма. Mb запасает кислород в мышцах. В дополнение к своей главной функции Hb и Mb катализируют различные редокс реакции связанные со стадиями одно или двух электронных реакций. В присутствии пероксида водорода ферри-формы Hb и Mb окисляются в оксоферрильные формы содержащие гемо центрированные радикалы и радикалы, центрированные на белковой глобуле. В реакции между ферри-Mb и пероксидом водорода в результате двух электронного окисления образуется оксоферрил порфирин радикал (соединение I), протеин Fe(IV=O) с радикалом, локализованным на порфириновом цикле и молекула воды: