

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 25 (64). 2012. № 4. С. 239-247.

УДК 577.152.193+544.723.23

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ ПОДЛОЖКИ НА МЕХАНИЗМ СОРБЦИИ ПЕРОКСИДАЗЫ РЕДЬКИ ЧЕРНОЙ

Вяткина О.В.

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: oksana_yyatkina@list.ru*

В статье приведены результаты сорбционных исследований в системах бентонит–пероксидаза, силикагель–пероксидаза. Установлены количественные параметры сорбционных процессов и механизм связывания фермент–подложка. Показано каталитическое действие полученных материалов.
Ключевые слова: пероксидаза, редька черная, сорбция, бентонит, силикагель.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день ферменты составляют неотъемлемую часть современных промышленных технологий, широко применяются в аналитических и медицинских целях. Существенным ограничителем масштабного использования ферментов является высокая цена коммерческих препаратов, что обусловлено сложностью их извлечения из природного сырья и очистки.

Обычно извлечение ферментов осуществляется с помощью молекулярных сит. Этот процесс в ряде случаев долгий, малоэффективный и дорогой. Практически не используются методы концентрирования и извлечения ферментов из природных материалов с использованием неорганических сорбентов. Это связано с тем, что большинство известных неорганических сорбентов либо вообще не концентрируют ферменты, либо обладает по отношению к ферментам небольшой емкостью [1–3]. Однако исследования в данном направлении не являются на сегодняшний день исчерпывающими из-за большого разнообразия структур и как следствие вариабельности сорбционных свойств природных и синтетических минеральных сорбентов. Поэтому целью работы являлось изучение механизмов сорбции пероксидазы редьки черной на природном бентоните и на силикагелях, синтезированных в кислой среде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась пероксидаза корнеплодов редьки черной, экстрагированная фосфатным буфером (рН=6,8) из измельченного растительного сырья [4]. В качестве подложки для иммобилизации фермента были использованы силикагели, синтезированные из силикатного клея при взаимодействии с 6М и 3М соляной кислотой. Далее маркированные как (СГ-А и СГ-Б), и природный бентонит Асканит (Грузия). Количество активных кислотных и основных гидроксидов (адсорбционных центров) на поверхности подложек определяли методом потенциометрического титрования растворами NaOH и HCl. Иммобилизацию ферментного препарата, выделенного из корнеплода редьки черной, на подложках проводили методом сорбции. Сорбцию фермента изучали в статических условиях при температуре 25°C, рН=6,8. Объёмную концентрацию ферментного препарата варьировали от 5 до 50%, время эксперимента варьировали от 1/6 до 24 часов. Остаточные концентрации фермента контролировали фотоколориметрически при $\lambda=400$ нм. После чего рассчитывали степень связывания фермента с твёрдой фазой N:

$$N (\%) = \frac{D_{нач} - D_{кон}}{D_{нач}} \cdot 100 \% ; \quad (1)$$

Где: N (%) – степень связывания фермента на подложке,

$D_{нач}$, $D_{кон}$ – начальная и конечная оптические плотности.

Для изучения обратимости сорбции фермента фермента в водных системах брали навески высушенного силикагеля, модифицированного пероксидазой, и заливали их дистиллированной водой. Через сутки определяли концентрацию фермента в водной фазе. Для уточнения природы активных центров поверхности носителей и механизмов связывания фермента с ними использовали метод ИК-спектроскопии (ИКС).

Определение средней пероксидазной активности нативных и иммобилизованных ферментных препаратов проводили в системах 1–3 при рН=6,8, $t=25^\circ\text{C}$, $\tau=10$ мин.

Система (1): $C(\text{H}_2\text{O}_2)= 0,02$ моль/л, $C(\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2) = 0,0001-0,001$ моль/л, V (ферментного препарата)=5 мл.

Система (2): $C(\text{H}_2\text{O}_2)= 0,02$ моль/л, $C(\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2) = 0,0001-0,001$ моль/л, иммобилизованная на силикагеле пероксидаза $m=1$ г.

Система (3): $C(\text{H}_2\text{O}_2)= 0,02$ моль/л, $C(\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2) = 0,0001 - 0,001$ моль/л, иммобилизованная на бентоните пероксидаза $m=1$ г.

Активность определяли по начальной скорости реакции пероксидазного окисления гидрохинона ($\tau=10$ мин). Изменение концентрации гидрохинона в исследуемых системах контролировали фотоколориметрическим методом по реакции с *o*-фенантролином в присутствии ионов Fe^{3+} [5]. За единицу активности принимали количество окисленного субстрата (мкмоль), катализированное 1 мл ферментного препарата в течение 1 мин.

Активность рассчитывали по формуле (2):

$$A (\text{активность}) = \frac{C(\text{гидрохинона}) \cdot V(\text{реакционной смеси, л})}{V(\text{фермента, мл}) \cdot t(\text{мин})} ; \quad (2)$$

$$1. \frac{\text{мкмоль(субстрата)}}{\text{мл(фермента) \cdot мин}} = 1 \text{ е. а.}$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оба полученных образца ксерогелей кремниевой кислоты имели белый цвет и были непрозрачны. Установлено, что с уменьшением концентрации растворов, соляной кислоты ксерогели получаются более хрупкими, что свидетельствует о различии их структуры. Результаты ИКС-исследования силикагеля (СГ-А) представлены на рис. 2 и в табл. 1.

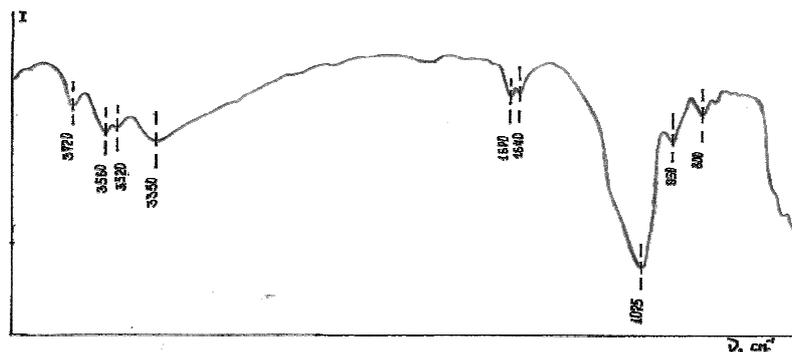


Рис. 2. ИК-спектр силикагеля СГ-А.

Таблица 1

Положение полос поглощения в ИК-спектре силикагеля и силикагеля с иммобилизованной пероксидазой [6–9]

Частота колебаний (см ⁻¹)		Тип колебаний	Атомная группа
силикагель	силикагель+пероксидаза		
3720	3720	ν	-ОН-основная (Н-связанная)
3520	—	ν	-ОН-кислотная (Н-связанная)
3560	3560	ν	H ₂ O (хемосорбированная)
3350	3350	ν	H ₂ O (адс)
—	3280	ν	N-H (амид А)
—	3067	δ	≡N-H ⁺
1670-1640	—	δ	H ₂ O (адс)
—	1630	ν	C=O (амид I)
—	1521	δ	N-H в плоскости (амид II)
1075	1080	ν _{as}	Si-O-Si
950	950	ν	Si-OH
800	800	обертон 2ν _s	Si-O

На ИК-спектре силикагеля СГ-А были идентифицированы полосы, отвечающие следующим видам колебаний поверхностных гидроксидов: 3720 см^{-1} – ν -колебания ОН-основная (Н-связанная), 3520 см^{-1} – ν -колебания Si-O-H –кислотная (Н-связанная). Наличие в спектре колебаний соответствующих основным гидроксидом закономерно, так как синтез силикагелей проводили при рН ниже изоэлектрической точки (ИЭТ), что сделало возможной перезарядку поверхности материала. Результаты определения количества активных силанольных групп и других сорбционных центров на поверхности ксерогелей представлены в табл. 2.

Таблица 2

Количество активных ОН-групп и другие характеристики поверхности исследуемых ксерогелей

	СГ-А	СГ-Б
	n(-ОН), ммоль-экв/г	
потенциометрическое титрование NaOH (0,1M)	0,10±0,007	0,08±0,004
потенциометрическое титрование HCl (0,1M)	0,06±0,002	0,10±0,001

Таким образом было установлено, что понижение величины рН при синтезе в области ниже ИЭТ силикагеля приводит к увеличению количества сорбционных центров, представленных кислотными гидроксидом и уменьшению количества основных гидроксидом поверхности.

Результаты, полученные при исследовании динамики процесса сорбции пероксидазы из фосфатно-буферных растворов с объёмной концентрацией пероксидазы 20% на силикагеле показали (рис. 3), что максимальная степень связывания фермента с подложкой наблюдается при времени контакта 2 часа и составляет 62%. Ранее было установлено, что в системе с бентонитом за 1,5 часа с поверхностью связывается 70% фермента.

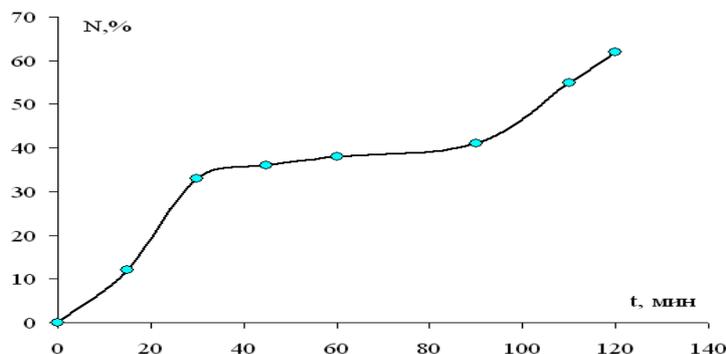


Рис. 3. Динамика сорбции пероксидазы на силикагеле из фосфатно-буферного раствора ($C_{об}=20\%$, $V=20$ мл, $m(СГ-А)=0,5$ г)

Проводить сорбцию более 2 часов оказалось не целесообразно, так как в системе на свету образуются неактивные продукты взаимодействия компонентов фосфатно-буферных растворов между собой, с компонентами подложки и кислородом, о чём свидетельствует окрашивание раствора в бурый цвет.

При изучении сорбции пероксидазы на силикагеле основную проблему составляла трудность определения массовых концентраций фермента в фосфатно-буферных экстрактах. Его количество оценивали по поглощению растворов при $\lambda=400$ нм, характерному для гем-содержащих белков. Поэтому для выявления характера сорбции строили графики, представленные на рис. 4.

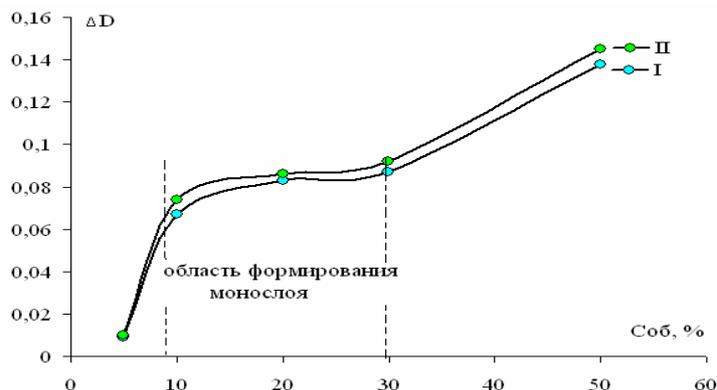


Рис. 4. Адсорбция пероксидазы редьки черной из фосфатно-буферных растворов на силикагеле: I – СИ-А; II – СИ-Б ($\tau=120$ мин.)

Как видно из рисунка, изменение концентрации в растворах при контакте с различными силикагелями практически идентично не смотря на различное количество силанольных групп на них и пористости, что говорит именно об адсорбции молекул фермента. Горизонтальный ход полученных кривых в интервале концентраций 10–30%, указывает на формирование монослоя пероксидазы на поверхности силикагеля в данном концентрационном диапазоне.

Ранее было установлено отсутствие линейного участка, параллельного оси концентраций на изотермах сорбции пероксидазы на бентоните, что, очевидно, связано с сорбцией фермента в первичных и вторичных порах минерала, размер которых соизмерим с размером молекулы пероксидазы.

В результате при иммобилизации пероксидазы редьки черной на силикагеле (СИ-А) и бентоните методом сорбции нами были получены материалы, содержание фермента в 1 г которого соответствует его содержанию в 5 мл нативного ферментного препарата, которые использовали в дальнейших исследованиях.

После выдерживания полученных препаратов в дистиллированной воде в течение 24 часов в водной фазе системы с силикагелем был обнаружен фермент, причем его количество составило около 70% от адсорбированного, тогда как сорбция пероксидазы на бентоните в данных условиях оказалась полностью

необратимой. Указанные механизмы сорбции изучаемого фермента на подложках подтвердились данными ИК-спектроскопии (рис. 5).

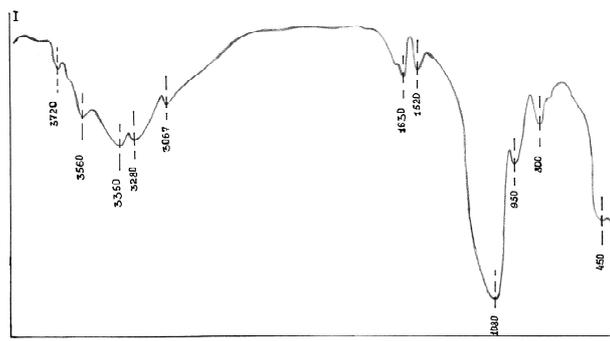


Рис. 5. ИК-спектр силикагеля (СГ-А), модифицированного пероксидазой.

Как видно из рис. 5 и таблицы 1, на ИК-спектре после адсорбции пероксидазы проявляются характерные для белков полосы амид I и амид II ($1500\text{--}1700\text{ см}^{-1}$), а так же амид A (3280 см^{-1}). Это позволяет заключить, что при адсорбции не происходит существенных изменений вторичной структуры белковой молекулы и, следовательно, ковалентное связывание фермента с функциональными группами поверхности отсутствует и возможна его десорбция в водную фазу. Однако при иммобилизации пероксидазы на силикагеле в ИК-спектре появляются изменения в области валентных колебаний связанных водородной связью кислотных и основных гидроксидов поверхности силикагеля (водородных связей ($3400\text{--}3750\text{ см}^{-1}$) и адсорбционной воды ($1670\text{--}1640\text{ см}^{-1}$)). Так значительно уменьшается интенсивность полосы 3720 см^{-1} и вовсе исчезает раздвоенная полоса $1670\text{--}1640\text{ см}^{-1}$ ($\delta\text{ H}_2\text{O}$ (адс)), что очевидно связано с образованием некоторого количества водородных связей белковой части фермента с поверхностью подложки, частично удерживающих пероксидазу от десорбции.

Данные, полученные с помощью ИК-спектроскопии бентонита, используемого в качестве подложки для иммобилизации пероксидазы и фермент – бентонитового комплекса представлены на рис. 6, 7 и в табл. 3.

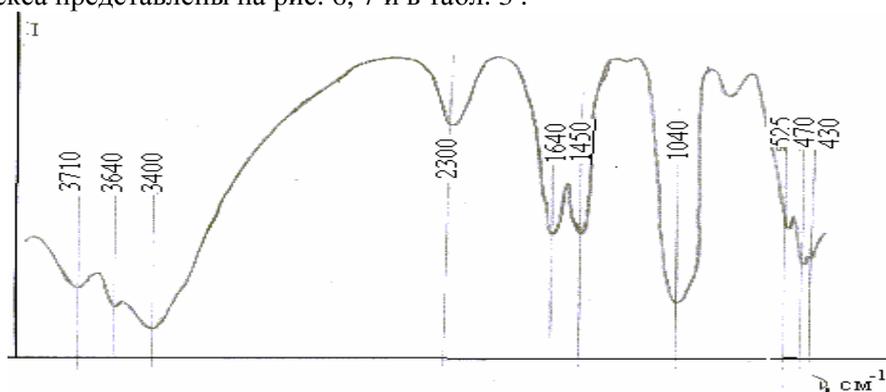


Рис. 6. ИК-спектр исследуемого бентонита.

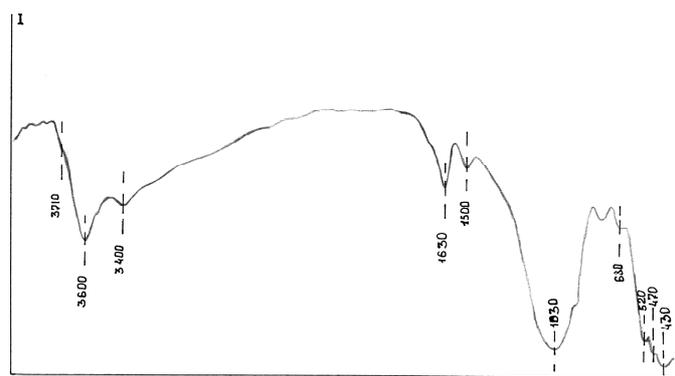


Рис. 7. ИК-спектр комплекса бентонит-пероксидаза.

Таблица 3

Положение полос поглощения в ИК-спектре бентонита [7, 9, 10]

Частота колебаний (см ⁻¹)		Тип колебаний	Атомная группа
Бентонит	Бентонит+пероксидаза		
3710, 3640	3600	v	-ОН (структурн.)
3400	3400	v	H ₂ O (адсорбц.)
2320	—	v	H ₂ O
1640	—	δ	H ₂ O
—	1630	v	C=O (амид I)
—	1500	δ	N-H в плоскости (амид II)
1450	—	δ	-ОН
1040	1030	v	Si-O- Si
—	680	δ	O=C-N в плоскости (амид IV)
525	520	δ	смешанные Si-O-Al и Mg-O
470	470	δ	Si-O
430	430	v	Fe(III)-O

Присутствие в ИК-спектре бентонита, контактировавшего с раствором фермента, полос, характерных для колебаний амидных групп белков (1630 – (v)C=O (амид I), 1500 – (δ)N-H в плоскости (амид II), мы их на спектре обозначим 680 – (δ) O=C-N в плоскости (амид IV)) подтверждает сорбционное связывание пероксидазы на подложке. Сдвиг и уменьшение интенсивности полос поглощения Амид-I с 1640 до 1630 и Амид-II с 1520 в 1500 обычно обусловлен изменениями CN-конформации белковой молекулы. Этот факт наряду с отсутствием полос поглощения характерных для валентных колебаний групп C-N (амид A, B) – 3300-3100 см⁻¹ и значительными изменениями спектра в области валентных колебаний свободных гидроксидов поверхности бентонита и адсорбированной воды свидетельствуют об образовании прочных химических связей молекул пероксидазы с бентонитом и подтверждают необратимость сорбции иммобилизованной

пероксидазы в воде. Причем вероятнее всего связывание идет вследствие взаимодействия основных гидроксидов поверхности бентонита, удельное количество которых составляет $0,43 \pm 0,007$ ммоль-экв/г, и на порядок превышает количество кислотных центров – $0,04 \pm 0,001$ ммоль-экв/г и карбоксильных групп белковой части фермента. Аналогичный тип связывания ранее был доказан в системе бентонит–желатин [11].

Результаты определения каталитической активности пероксидазы в системах 1–3 показали, что активность нативной пероксидазы относительно гидрохинона в системе 1 составляет $0,1 \pm 0,01$ е.а., а в системах с иммобилизованной на силикагеле пероксидазой (система 2) средняя ферментативная активность по отношению к гидрохинону увеличивается в 2 раза, а в системе с комплексом бентонит–пероксидаза (система 3) в 7 раз. Таким образом установили, что исследуемый фермент катализирует пероксидазное окисление гидрохинона как в нативной, так и в иммобилизованной на форме.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что понижение величины рН синтеза в области ниже ИЭТ силикагеля приводит к росту степени развитости поверхности, при этом количество сорбционных центров, представленных кислотных гидроксидов увеличивает, а основных падает.
2. Доказано, что сорбция пероксидазы редьки черной на бентоните необратима при $t=25$ °С и нейтральном значении рН, а сорбция пероксидазы на силикагеле обратима на 70%.
3. Установлена оптимальная длительность сорбции пероксидазы редьки черной из 20% по объему водных растворов экстрактов фермента при $t=25$ °С. На бентоните $\tau_{\text{опт}}=1,5$ часа, при этом степень связывания фермента – 70 об.%, а на силикагеле $\tau_{\text{опт}}=2$ часа, максимальная степень связывания фермента с подложкой составляет 62%.
4. Выявлено, что иммобилизация пероксидазы редьки черной на бентоните и силикагеле увеличивает ее активность в реакции окисления гидрохинона.

Список литературы

1. Пат. №:2353652., РФ, МПК С12N9/02 Способ получения фермента пероксидазы из корней хрена / Д. В. Бочков (РФ), Т. Г. Толстикова (РФ), А. О. Брызгалов (РФ), М. В. Хвостов (РФ). – №2007135916/13; Заявлено 27.09.2007.; Опубл. 27.04.2009.
2. Пат. №: 2130070. РФ, МПК С12N9/08 Способ получения пероксидазы / А.А. Гусев (РФ), В.Д. Борзионов (РФ), А.С. Красоткина (РФ). – №97119125/13; Заявлено 24.11.1997.; Опубл. 10.05.1999.
3. Пат. №: 2388819. РФ, МПК С12N9/08 Способ получения пероксидазы хрена / В.И. Суровцев (РФ), В.М. Борзенков (РФ), К.В. Детушев (РФ). – №2008125459/13; Заявлено 27.12.2009.; Опубл. 10.05.2010.
4. Селибер Г.Л. Большой практикум по микробиологии / Г.Л. Селибер. – М.: Мир, 1962. – 492 с.
5. Лурье Ю. Ю. Химический анализ производственных сточных вод / Ю. Ю. Лурье, А. И. Рыбников. – М.: Химия, 1974. – 395 с.
6. Накамото К. ИК-спектры и спектры КР неорганических и координационных соединений / К. Накамото; пер. с англ. – М.: Мир, 1991. – 536 с.
7. Волькенштейн М.В. Молекулярная биофизика / М.В. Волькенштейн. – М.: Наука, 1975. – 616 с.

8. Чукин Г.Д. Химия поверхности и строение дисперсного кремнезёма / Г.Д. Чукин. – М.: Типография Паладин, ООО «Принта», 2008. – 172 с.
9. Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Селеменов В.Ф. ИК спектроскопия для исследования комплекса инулаза – носитель / И.В.Шкутина, О.Ф.Стоянова, В.Ф. Селеменов // Вестник ВГУ. – 2004. – № 1. – С. 110–113.
10. Болдырев А.И. Инфракрасные спектры минералов / А.И. Болдырев. – М.: Недра, 1976. – 199 с.
11. Ботнарь О.С., Вяткина О.В., Толстенко Д.П. Изучение сорбционных взаимодействий в системе бентонит–желатин–галлотанин–H₂O / О.С. Ботнарь, О.В. Вяткина, Д.П. Толстенко // Дев'ята Всеукраїнська конференція студентів та аспірантів «Сучасні проблеми хімії»:тези допов. – К., 2008. – С. 108.

Вяткіна О.В. Вплив природи підкладки на механізм сорбції пероксидази чорної редьки / О.В. Вяткіна // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 4. – С. 239-247.

У статті наведені результати сорбційних досліджень в системах бентоніт–пероксидаза та силікагель–пероксидаза. Встановлені кількісні параметри сорбційних процесів і механізм зв'язування фермент–підкладка. Показана каталітична дія отриманих матеріалів, щодо гідрохінону.

Ключові слова: пероксидаза, чорна редька, сорбція, бентоніт, силікагель.

Vyatkina O.V. Effect of the nature of the substrate on the sorption mechanism peroxidase radish black / O.V. Vyatkina // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 4. – P. 239-247.

The article presents the results of sorption studies in bentonite–peroxidase, silicagel–peroxidase systems. The quantitative parameters of the sorption processes and the mechanism of linkage enzyme-substrate are established. It is shown catalytic activity on of the received materials related hydroquinone.

Keywords: peroxidase, radish black, sorption, bentonite, silicagel.

Поступила в редакцію 18.11.2012 г.