

# ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

---

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского  
Биология, химия. Том 2 (68). 2016. № 2. С. 86–92.

**УДК 544.4**

## **ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ИММОБИЛИЗАЦИИ ПЕРОКСИДАЗЫ КОРНЕПЛОДА РЕДЬКИ ЧЕРНОЙ НА КИНЕТИКУ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ ГИДРОХИНОНА**

*Вяткина О. В., Биба М. В., Ярощук А. В., Бажин В. Ю.*

*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия  
E-mail: oksana\_yuatkina@list.ru*

Предложен способ получения препарата с пероксидазной активностью путем включения фермента, выделенного из корнеплода редьки черной, в поры силикагеля. Установлено, что при иммобилизации пероксидазы на силикагеле золь-гель методом происходит физическое связывание «подложка – фермент», что повышает активность фермента по гидрохинону в сравнении с его нативной формой, однако приводит к потере катализатора в процессе очистки препарата от хлорид-ионов и осложнению в исследуемых системах каталитических процессов сорбционными.

**Ключевые слова:** пероксидаза, иммобилизация, ферментная активность, гидрохинон.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Ферменты являются высокоактивными и селективными катализаторами многочисленных химических превращений. Известно, что иммобилизация ферментов позволяет повысить их активность, термо- и кислотоустойчивость, а также продлить сроки их хранения. Существуют по меньшей мере четыре области, в которых могут найти применение иммобилизованные ферменты, а именно: промышленность, охрана окружающей среды, различные анализы и производство лекарственных препаратов. В связи с этим получение новых ферментных препаратов путем иммобилизации ферментов различными методами на водонерастворимых носителях является актуальной задачей. Поэтому представленная работа посвящена изучению иммобилизации пероксидазы редьки черной на силикагеле золь-гель методом, а также изучению активности полученных ферментных препаратов в реакции окисления гидрохинона в водном растворе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась пероксидаза корнеплодов редьки черной, экстрагированная из очищенного и измельченного растительного сырья 2М раствором хлорида аммония (рН=5,5).

Имобилизацию фермента проводили золь-гель методом в двух системах: в системе I, где соотношение объемов экстракта фермента и силикатного клея (жидкое стекло, силикатный модуль 2,7–3,9) составляло 1:1, и в системе II, где использовали силикатный клей, разбавленный в отношении 1:1 дистиллированной водой. Полученные осадки разделяли на две части. Одну часть оставляли сушиться на воздухе при комнатной температуре (А), вторую часть промывали большим количеством дистиллированной воды для устранения хлорид-анионов (В). Полученный осадок также оставляли сушиться на воздухе при комнатной температуре.

Активность ферментных препаратов определяли по начальной скорости окисления субстрата-восстановителя. Изменение концентрации гидрохинона контролировали фотоколориметрическим методом по реакции с *o*-фенантролином в присутствии ионов  $Fe^{3+}$  ( $\lambda=540$  нм,  $l=2$  см). За единицу удельной активности приняли количество окисленного субстрата (мкМ), катализированного 1г ферментного препарата (пероксидаза, иммобилизованная на силикагеле) на протяжении 1 минуты.

Варьирование начальной концентрации гидрохинона от  $1 \cdot 10^{-4}M$  до  $1 \cdot 10^{-2}M$  в исследуемых системах позволило определить кинетические параметры его ферментативного окисления. Эффективные кинетические параметры: порядок ( $n_{эф}$ ) и константу скорости реакции ( $k_{эф}$ ) определяли графическим методом в координатах Вант-Гоффа. Для расчета максимальной скорости ферментативной реакции ( $w_{max}$ ) и константы Михаэлиса ( $K_m$ ) использовали координаты Лайнуивера – Берка.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента в системе I в течение 60 секунд наблюдалось выпадение аморфного осадка, а для понижения рН до 7 в систему добавляли 1н. HCl. В системе II время выпадения крупнозернистого осадка составляло 15–30 секунд. При промывании полученных осадков фотоколориметрический контроль промывных вод ( $\lambda=400$  нм) показал наличие пероксидазы (рис. 1), что свидетельствует о физическом включении молекул фермента в гель.

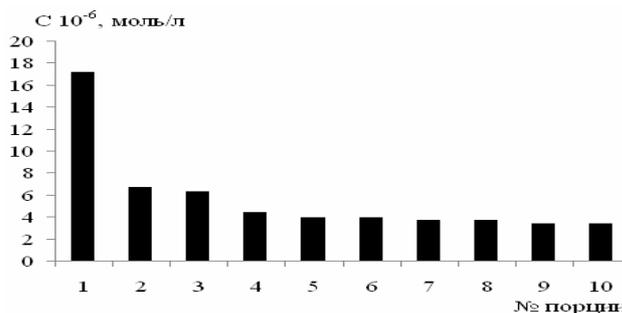


Рис. 1. Динамика вымывания пероксидазы из силикагелевой матрицы при очистке от хлорид-ионов ( $V_{\text{порции}} = 30\text{мл}$ , система IB).

Для сравнения эффективности иммобилизации золь-гель методом и методом физической сорбции было проведено сопоставление результатов определения активности по гидрохинону с ранее нами опубликованными данными [1–3], что приведено в табл. 1. Было установлено, что активность иммобилизованного фермента выше, чем его активность в нативной форме, а иммобилизация золь-гель методом в большинстве случаев показывает лучшие результаты, чем иммобилизация методом физической сорбции, и только физическая сорбция пероксидазы на силикагеле, полученном при  $\text{pH}=10$ , дает результат, соизмеримый с системой IA.

**Таблица 1**  
**Сравнительная характеристика активности пероксидазы редьки черной**

Пероксидаза	Активность (A), е.а.
*Нативная [1]	0,1±0,01
Иммобилизация золь-гель методом	
IA	10±0,08
IB	2,5±0,04
IIA	7±0,05
IIB	15±0,10
Иммобилизация методом физической сорбции	
* $\text{pH}_{\text{синтеза}} < 2$ [1]	0,2±0,02
* $\text{pH}_{\text{синтеза}} = 10$ [2]	10,6±0,02
* $\text{pH}_{\text{синтеза}} = 7$ [3]	1,7±0,1

Примечание: символом (\*) помечены значения, взятые для сравнения из ранее опубликованной литературы [1–3].

Экспериментально было определено, что большей ферментной активностью в исследуемой реакции окисления гидрохинона из систем IA и IB обладает система

IA. Понижение активности фермента в системе IB можно объяснить его вымыванием с поверхности носителя в процессе его отмывки от хлоридов. Уменьшение активности препарата, гелеобразование которого проводили из разбавленного 1:1 раствора силикатного клея, по-видимому, обусловлено изменением структуры каркаса (выпадение крупнозернистого осадка) и, следовательно, количества связанного фермента. Однако в системе IB, не смотря на вымывание фермента, была установлена аномально высокая эффективная пероксидазная активность. Объяснение этого факта было невозможно без изучения кинетических параметров процесса окисления гидрохинона в присутствии полученных материалов (табл. 2).

Результаты исследования кинетики ферментативного окисления гидрохинона в модельных системах с полученными золь-гель методами препаратами приведены в табл. 2.

Таблица 2

**Кинетические параметры ферментативного окисления гидрохинона пероксидом водорода в исследованных системах.**

	Субстрат	$k_{эф}$	$n_{эф}$	$w_{max}$ , моль/л•с	$K_m$ , моль/л
IA	гидрохинон	$2 \cdot 10^{-2}$	1	$2,0 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-4}$
IB	гидрохинон	$3 \cdot 10^{-3}$	0,8	$3,7 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-3}$
IIA	гидрохинон	$5 \cdot 10^{-3}$	0,7	$3,8 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-4}$
IBB	гидрохинон	$2 \cdot 10^{-1}$	1,3	–	–

Как видно из таблицы 2, значения эффективных констант скорости окисления гидрохинона в исследуемых системах хорошо коррелируют со значениями средних активностей ферментных препаратов. Однако обращает на себя внимание тот факт, что эффективный порядок исследуемых реакций по субстрату-восстановителю во всех системах, кроме системы IA, отличен от единицы, характерной для ферментативных процессов. Причем если в системах IB и IIA значение порядка реакции меньше единицы может быть обусловлено проведением эксперимента с использованием диапазона концентраций, включающего значения, превышающие  $K_m$ , то в системе IBB значение  $n_{эф}$  по гидрохинону больше единицы, что свидетельствует об осложнении исследуемого ферментативного окисления побочными процессами. Таковым, в частности, может быть сорбция гидрохинона на участках силикагеля, свободных от фермента, общая площадь которых явно увеличивается при отмывке препаратов от хлоридов. В результате остаточная

концентрация гидрохинона в системе резко падает, и мы наблюдаем в системе, даже при вымывании фермента из препарата, резкое увеличение кажущейся скорости конверсии гидрохинона и, следовательно, мнимое увеличение активности фермента. Резкое отклонение от линейности графика зависимости в координатах Лайнуивера – Берка для системы ПВ (рис. 2) и отрицательная ордината точки пересечения расчетной прямой подтверждают сложность протекающих процессов и невозможность их кинетического описания через параметры ферментативной кинетики и уравнение Михаэлиса – Ментен.

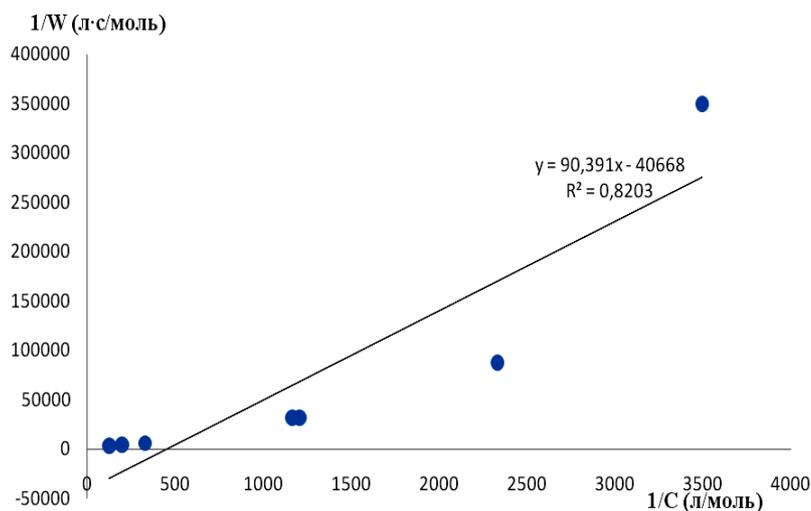


Рис. 2. Зависимость начальных скоростей реакции ферментативного окисления гидрохинона от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера – Берка для системы ПВ.

Влияние сорбционных процессов на скорость конверсии гидрохинона также прослеживается в системе IV, где фермент вымывался из матрицы при удалении хлоридов, и выражается в увеличении  $K_M$  по сравнению с системой IA (то есть увеличением общего числа каталитических и сорбционных центров, связывающих гидрохинон), что также объясняет возрастание эффективного значения максимальной скорости ферментативной реакции при понижении эффективной константы скорости процесса конверсии гидрохинона. Аналогичная ситуация наблюдается и в системе IIА.

Таким образом, проведенные исследования показали, что наиболее удачная методика золь-гель иммобилизации пероксидазы редьки черной на силикагеле была реализована при получении системы IA, в результате чего создан препарат, обладающий пероксидазной активностью, на два порядка превышающей активность нативной пероксидазы, выделенной в аналогичных условиях, и не инактивирующийся в течение 35 суток при температуре хранения 4°C.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что при иммобилизации пероксидазы на силикагеле предложенным способом происходит физическое связывание «подложка – фермент».
2. Доказано, что иммобилизация золь-гель методом повышает эффективную активность ферментов по гидрохинону в сравнении с нативным ферментом на два порядка.
3. Определены оптимальные условия иммобилизации пероксидазы золь-гель методом.

### Список литературы

1. Ermakova M. Immobilization as a stabilization and regulation method of peroxidase radish black substrate specificity / M. Ermakova, O. Vyatkina // Peer-reviewed articles 8th International Bata Conference for Ph.D. Students and Young Researchers. – 2012. – Vol. 8, № 116. – P. 1–8.
2. Вяткина О. В. Каталитическая активность пероксидазы редьки черной иммобилизованной на бентоните в водных системах с гидрохиноном / О. В. Вяткина, И. В. Лаврентьева // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского, серия «Биология, химия». – 2010. – Т. 23(62), № 4. – С. 260–267.
3. Аралкин О. Л. Роль сорбционных взаимодействий фермент-силикагель в процессе получения пероксидазных катализаторов / О. Л. Аралкин, М. В. Биба, А. Н. Кунык // Научное сообщество студентов XXI столетия. Естественные науки: электронный сборник статей по материалам XXX студенческой международной заочной научно-практической конференции. (Новосибирск, апрель 2015). – № 4 (29). – С. 166–176.

### THE INFLUENCE OF BLACK RADISH PEROXIDASE IMMOBILIZATION METHODS ON KINETICS CATALYTIC HYDROQUINONE OXIDATION

*Vyatkina O. V., Biba M. V., Yaroshchuk A. V., Bajin V. U.*

*V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russian Federation  
E-mail: oksana\_vyatkina@list.ru*

Enzymes are highly selective catalysts of a numerous chemical transformations. It is known that the enzyme immobilization allows increasing their activity, heat and acid resistance and also extending their storage period. Thus, obtaining new enzymatic agents by various methods of enzyme immobilization on insoluble carriers is a promising task. Presented work is dedicated to the study of black radish peroxidase immobilization on silica gel by means of sol-gel method, as well as the study of the enzymatic agents' activity obtained as a result of oxidation reaction of hydroquinone in an aqueous solution.

The proposed method of obtaining agents with peroxidase activity is carried out by including the enzyme derived from black radish root into the silica gel pores. It is established that during peroxidase immobilization on silica gel by means of sol-gel method occurs a physical binding between substrate and enzyme. It increases the effective enzyme activity on hydroquinone comparing to its native form. However, it leads to

catalyst loss during the process of purifying the target product from chloride ions and complications of catalytic process in connection with sorption in investigated systems.

Therefore black radish peroxidase immobilization by including into the silica gel pores is advisable to carry out in the system chloride ammonium peroxidase extract/silicate adhesive (not diluted water glass) in volumetric ratio of 1: 1 at pH = 7, followed by drying the xerogel under air at room temperature, without removal chloride ions from it.

**Keywords:** peroxidase, immobilization, enzymatic activity, hydroquinone.

#### References

1. Ermakova M., Vyatkina O. Immobilization as a stabilization and regulation method of peroxidase radish black substrate specificity, *Peer-reviewed articles 8th International Bata Conference for Ph.D. Students and Young Researchers*, **8** (116), 1 (2012).
2. Vyatkina O. V., Lavrentieva I. V. Catalytic activity of black radish peroxidase immobilizing on bentonides in a aqueous system with hydroquinone, *Scientists notes of Tavrida national university named by V.I.Vernadsky, "Biology and chemistry" series*, **23(62)** (4), 260 (2010).
3. Aralkin O. L., Biba M. V., Kunyk A. N. Function of sorption reaction enzyme-silica gel in process of reception peroxidase's catalyst, *Scientists association of student 21-th century. Natural sciences: electronic collection of articles by materials of 30-th student's international behind one's back science-practical conferential*, **4(29)**, 166 (2015).