

**УДК 577.152.1:544.478.32**

**ВЛИЯНИЕ МОРФОЛОГИИ ПОДЛОЖКИ НА КИНЕТИКУ  
ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ ГИДРОХИНОНА В СИСТЕМЕ С  
ИММОБИЛИЗОВАННЫМ ФЕРМЕНТОМ, ЭКСТРАГИРОВАННЫМ ИЗ  
КОРНЕПЛОДОВ РЕДЬКИ ЧЕРНОЙ**

*Вяткина О. В., Аралкина М. В., Аралкин О. Л., Бажин В. Ю., Прошина И. В.*

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

Изучены кинетические параметры реакции пероксидазного окисления гидрохинона в системах с ферментом, иммобилизованным на силикагелях, полученных из кремниевой кислоты, осажденной при различных рН. Определены условия иммобилизации пероксидазы (время сорбции, концентрация фермента в растворе) на исследованных силикагелях, при которых фермент максимально активен в реакции окисления гидрохинона пероксидом водорода. Показано, что при иммобилизации пероксидазы на водонерастворимой подложке морфология последней определяет характер сорбции фермента, а следовательно, и каталитическую активность полученных ферментных препаратов.

**Ключевые слова:** пероксидаза, иммобилизация, гидрохинон, кинетические параметры.

**ВВЕДЕНИЕ**

Пероксидаза – фермент, относящийся к гемсодержащим гликопротеидам, катализирующим реакции оксидазного, пероксидазного и оксигеназного окисления субстратов. Практическое применение пероксидазы обусловлено такими ее свойствами, как хорошая растворимость в воде, высокая специфичность по субстрату-окислителю, широкий спектр биологической, в том числе антиоксидантной активности. Однако нативная пероксидаза имеет ряд недостатков, а именно: высокую чувствительность к внешним факторам (температуре, кислотности среды), неустойчивость при хранении. Решением части указанных проблем является иммобилизация фермента на водонерастворимых подложках. В качестве подложек весьма перспективно использование силикагелей, структура и свойства которых могут варьироваться в зависимости от рН синтеза [1]. Представленная работа посвящена исследованию влияния морфологии силикагелевой подложки на каталитическую активность иммобилизованной пероксидазы корнеплодов редьки черной относительно субстрата-восстановителя – гидрохинона.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись препараты с пероксидазной активностью, полученные методом сорбции фермента, экстрагированного из корнеплодов редьки черной на силикагелевых подложках. Экстракцию фермента фосфатным буфером (рН=7) из очищенного и измельченного растительного сырья проводили по методике, описанной Селибером без дальнейшей очистки [2]. Содержание нативной пероксидазы в фосфатно-буферном экстракте, оцененное по количеству каталитически активных центров ферри-порфирина (далее – а. ц.) в единице объема, которое определяли фотоколориметрически ( $\lambda=400$  нм,  $l=2$  см,  $\epsilon_{400}=9,6 \cdot 10^4 \frac{\text{л}}{\text{моль} \cdot \text{см}}$ )

[3], составило 620 нмоль/л. В качестве субстрата-восстановителя использовали гидрохинон, концентрации которого варьировали в диапазоне  $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$  моль/л и контролировали фотоколориметрически по реакции с железом(III) в присутствии *o*-фенантролина ( $\lambda=540$  нм,  $l=1$  см) [4]. Субстрат-окислитель – пероксид водорода (фармакопейный), концентрация – 0,05 моль/л. Точную концентрацию раствора пероксида водорода устанавливали методом перманганатометрического титрования.

В качестве водонерастворимых подложек для иммобилизации фермента были использованы силикагели, полученные из кремниевой кислоты, осажденной при различных рН. Для получения силикагелей в химические стаканы приливали силикатный клей «Жидкое стекло» (марка Б, силикатный модуль 2,6–3,0) с исходным рН=12 и разбавляли его 1:3 дистиллированной водой при тщательном перемешивании. После чего, не прекращая перемешивания, понижали рН системы до 10 и 2 соответственно добавлением к полученному золю по каплям раствора 6М соляной кислоты. Образовавшиеся осадки поликремниевой кислоты промывали дистиллированной водой до удаления хлорид-ионов, наличие которых проверяли по качественной реакции с нитратом серебра. Промытые осадки помещали в чашку Петри и высушивали при температуре 150 °С. Высушенные ксерогели растирали в фарфоровой ступке и просеивали через контрольные сита, получая фракцию с зернением 0,25 мм, используемую в дальнейших исследованиях.

В ходе ранее проведенных исследований нами были определены оптимальные условия иммобилизации фермента методом его сорбции из фосфатно-буферных экстрактов на рассматриваемых в работе силикагелях. Препараты, полученные в таких условиях, обладали наибольшей по сравнению с другими пероксидазной активностью, определенной по гидрохинону [5]. Был установлен характер сорбции и степень связывания фермента с подложкой [6]. Так, для иммобилизации пероксидазы на силикагель с рН осаждения кремниевой кислоты 10 готовили систему, состоящую из 10 г силикагеля, 70 мл фосфатно-буферного экстракта пероксидазы (рН=7), 105 мл дистиллированной воды (молярная концентрация активных центров фермента в жидкой фазе сорбционной системы 248 нмоль/л) и оставляли на 60 мин. По истечении времени раствор фильтровали и твердую фазу сушили на воздухе при комнатной температуре. В результате был получен материал, содержание активных центров фермента в 1 г которого, по данным сорбционных исследований, составляло 2,5 нмоль. Для иммобилизации пероксидазы на силикагель, полученный при рН=2, готовили систему, состоящую

из 5 г силикагеля, 42 мл фосфатно-буферного экстракта пероксидазы (рН=7), 165 мл дистиллированной воды (молярная концентрация активных центров фермента в жидкой фазе сорбционной системы 124 нмоль/л). По истечении 120 мин. экспозиции твердую фазу отделяли фильтрованием и высушивали. В результате получали материал, содержащий 3 нмоль активных центров фермента в 1 г.

Активность исследуемых ферментных препаратов определяли по начальной скорости окисления субстрата-восстановителя – гидрохинона. За единицу активности (е. а.) принимали количество гидрохинона (мкмоль), каталитически окисленного на протяжении 1 минуты одним мкмоль а. ц. фермента (нативного или сорбированного на подложке):

$$A = \frac{\Delta C(\text{гидрохинона, мкмоль/л}) \cdot V(\text{реакционной смеси, л})}{\nu(\text{а.ц. фермента, мкмоль}) \cdot t(\text{мин})}; \quad (1)$$

Кинетика окисления гидрохинона пероксидом водорода в присутствии нативой пероксидазы редьки черной была изучена нами ранее [7]. Для формирования гетерогенных каталитических систем по 1 г ферментных препаратов, полученных иммобилизацией пероксидазы на силикагелях в оптимальных условиях, вносили в водные растворы, содержащие различные концентрации гидрохинона ( $1 \cdot 10^{-6}$  –  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л) и 0,05 моль/л пероксида водорода (объем жидкой фазы 50 мл). Выдерживали системы 10 мин., затем инактивировали фермент введением в систему 1 мл 1М серной кислоты (рН<sub>системы</sub> ≈ 1), после чего катализатор удаляли фильтрованием, в фильтрате определяли остаточные концентрации гидрохинона фотоколориметрически.

Экспериментальные данные использовали для расчета начальных скоростей реакции (w). Эффективные кинетические параметры – порядок ( $n_{эфф}$ ) и константу скорости реакции ( $K_{эфф}$ ) – 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

Результаты определения каталитической активности иммобилизованного фермента в исследованных системах показаны на рис. 1–4, определенные графическими методами кинетические параметры пероксидазного окисления гидрохинона сведены в табл. 1.

Как показано в табл. 1, активность пероксидазы, иммобилизованной на силикагеле, осажденном при рН=10, в оптимальных условиях возросла по сравнению с тем же ферментом, иммобилизованным на силикагеле, осажденном при рН=2, и нативным ферментом. Вероятнее всего, это связано с тем, что изменение рН осаждения силикагеля ведет к изменению его структурных характеристик и, следовательно, механизма сорбции пероксидазы. Как известно, активность ферментного препарата определяется не только количеством фермента на подложке, но и конформацией его молекул, и поэтому она будет существенно зависеть от способа связывания фермента подложкой [8].

Таблица 1  
Кинетические параметры пероксидазного окисления гидрохинона

Пероксидаза	$k_{эфф}$	$n_{эфф}$	$w_{max}$ , МОЛЬ/Л·С	$K_m$ , МОЛЬ/Л	A, е. а.
Нативная	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$\approx 1$	$4,1 \cdot 10^{-6}$	$0,7 \cdot 10^{-2}$	$1,6 \cdot 10^2$
Иммобилизованная на силикагеле, осажденном при pH=10	$5,0 \cdot 10^{-2}$	0,9	$1,7 \cdot 10^{-3}$	$1,7 \cdot 10^{-2}$	$1,7 \cdot 10^4$
Иммобилизованная на силикагеле, осажденном при pH=2	$1,7 \cdot 10^{-3}$	$\approx 1$	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$20 \cdot 10^{-2}$	$3,2 \cdot 10^2$

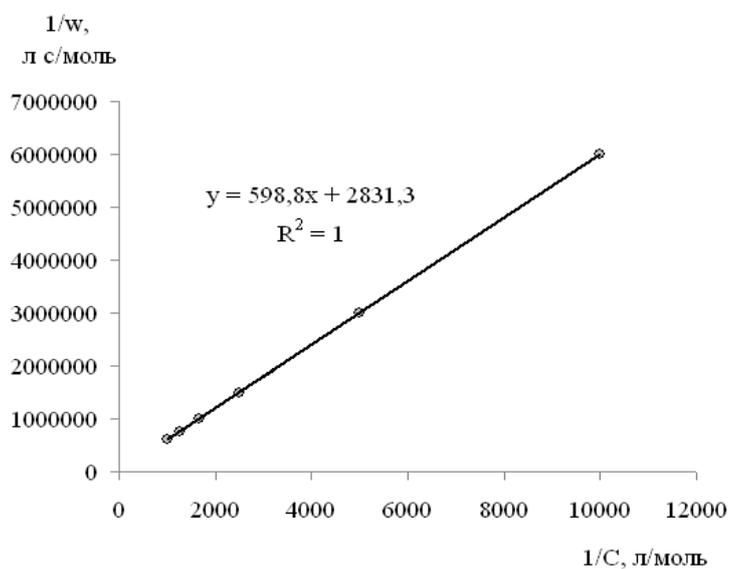


Рис. 1. Зависимость начальных скоростей реакции окисления гидрохинона в системах с пероксидазой, иммобилизованной на силикагеле, осажденном при pH=2, от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера – Берка

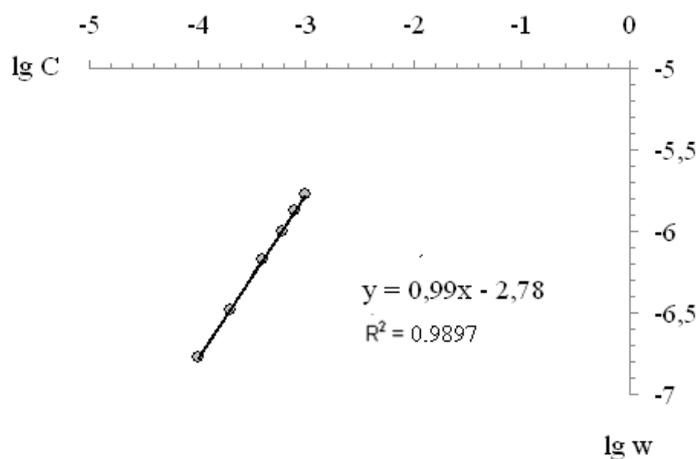


Рис. 2. Кинетика окисления гидрохинона в системе с пероксидазой, иммобилизованной на силикагеле, осажденном при рН=2, в координатах Вант-Гоффа

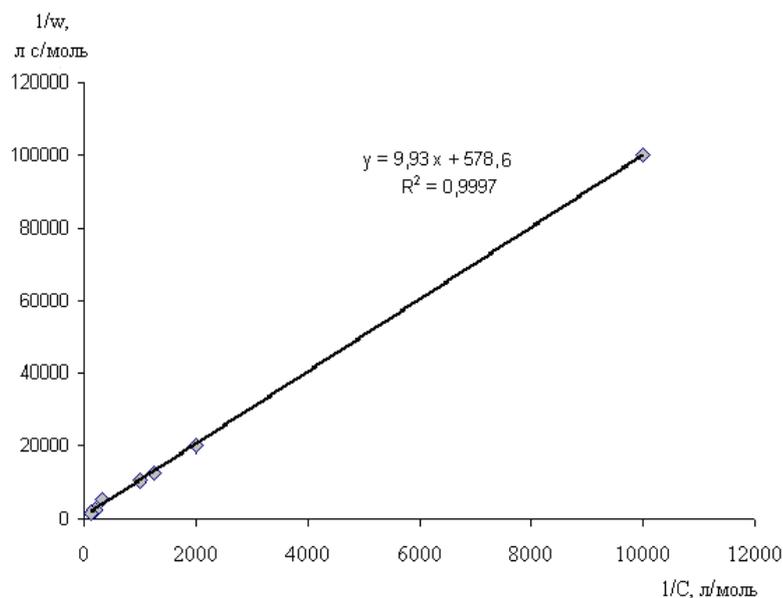


Рис. 3. Зависимость начальных скоростей реакции окисления гидрохинона в системах с пероксидазой, иммобилизованной на силикагеле, осажденном при рН=10, от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера – Берка

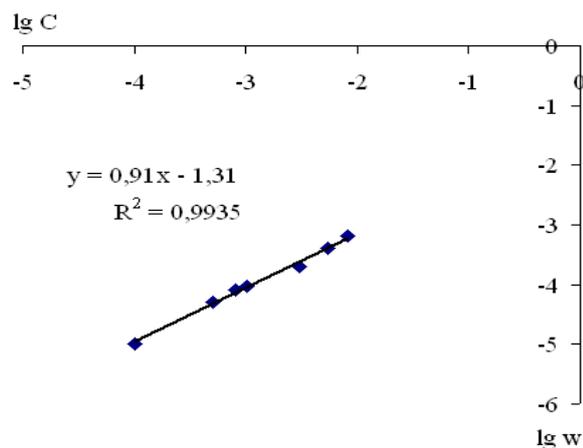


Рис. 4. Кинетика окисления гидрохинона в системе с пероксидазой, иммобилизованной на силикагеле, осажденном при рН=10, в координатах Вант-Гоффа

Ранее проведенные нами исследования показали, что формирование монослоя адсорбата на подложке, осажденной при рН=10, происходит в диапазоне концентраций фермента в растворе от 240 нмоль/л до 310 нмоль/л, тогда как на силикагелях, осажденных при рН=2, в диапазоне 60–190 нмоль/л (рис. 5). Это, очевидно, связано с сорбцией молекул пероксидазы не только на поверхности силикагеля, осажденного при рН=10, но и в порах, соизмеримых с молекулярными размерами фермента. Как правило, формирование полимолекулярных слоев фермента на поверхности подложек ведет к уменьшению активности полученных препаратов, поэтому оптимальные условия синтеза ферментного препарата и предполагали его сорбцию в системе, где сформированный монослой, и тем более полислоем, отсутствуют.

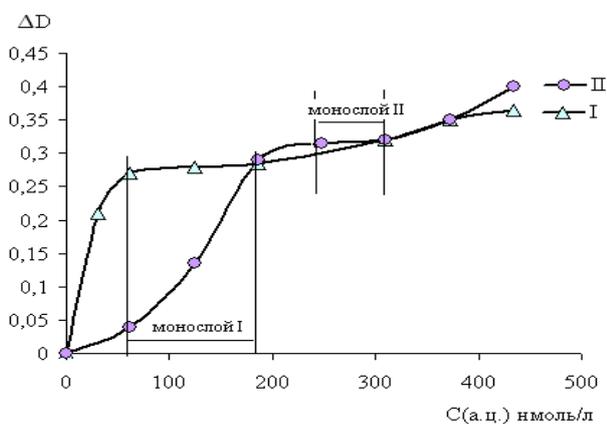


Рис. 5. Влияние рН синтеза силикагелевой подложки на механизм сорбции из фосфатно-буферных растворов пероксидазы редьки черной [6]

I – рН осаждения силикагеля 2; II – рН осаждения силикагеля 10

Для определения поверхностной структуры силикагелей был проведен анализ синтезированных образцов методом растровой электронной микроскопии. В результате были четко показаны морфологические различия между силикагелями с рН осаждения 10 и рН осаждения 2. На микрофотографии (рис. 6) видно, что диапазон диаметров пор материала, полученного при рН=2, достаточно широк и колеблется в пределах от 0,9 до 12,9 микрон. Вероятно, что данная структура силикагеля способствует образованию на его поверхности монослоя фермента из-за ограниченной сорбционной доступности пор, что ведет к резкому снижению активности данного ферментного препарата по сравнению с другим образцом.

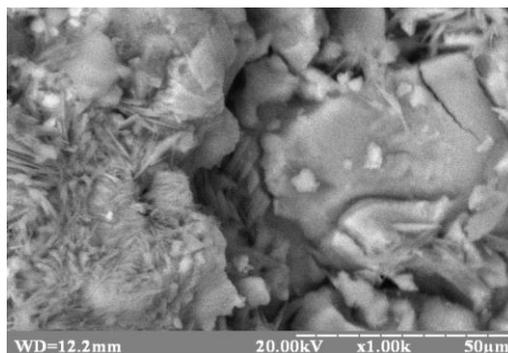
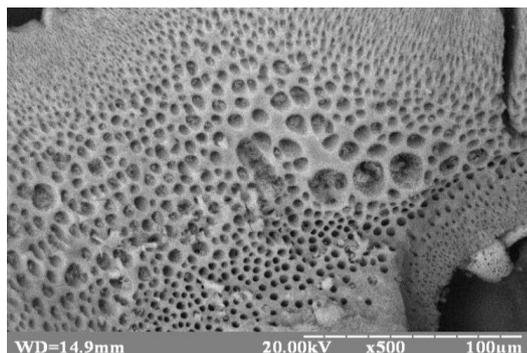


Рис. 6. Микрофотография поверхности силикагеля, полученного при рН=2

Рис. 7. Микрофотография поверхности силикагеля, полученного при рН=10

Поверхность силикагеля с рН осаждения 10 представляет собой совокупность нескольких субфаз (рис. 7), в частности игольчатых выростов на поверхности основной субфазы. Также наблюдается наличие множества вторичных пор, поэтому можно предположить высокую удельную площадь поверхности данного материала. Подобная неоднородная структура поверхности практически исключает образование монослоя адсорбата на поверхности, что позволяет достичь максимальных значений активности фермента, иммобилизованного на поверхности данного силикагеля

Отличия в активностях исследуемых ферментных препаратов коррелируют со значениями кинетических параметров каталитического окисления гидрохинона (табл. 1). В ходе эксперимента было установлено, что максимально эффективным катализатором в исследуемом процессе является пероксидаза, иммобилизованная на силикагеле, синтезированном при рН=10. Скорость ферментативного окисления гидрохинона  $w_{max}$  на порядок выше, чем во второй гетерогенной системе, и на три порядка превышает значение в гомогенной системе с нативным ферментом, аналогичная тенденция прослеживается и в случае со значениями эффективных констант скорости  $k_{эф.}$ . В то же время селективность относительно субстрата-восстановителя данного катализатора исходя из значения константы Михаэлиса  $K_m$  повышается по сравнению с ферментом, иммобилизованным на силикагеле с рН

осаждения 2. По-видимому, это связано с обратимостью сорбции фермента на последней подложке и возможностью сорбции гидрохинона на освободившейся поверхности [6]. Установлено, что максимально избирателен относительно гидрохинона нативный фермент.

Эффективный порядок реакции окисления гидрохинона в системе с пероксидазой, иммобилизованной на силикагеле, осажденном при рН=10, составил 0,9 (рис. 4). Вероятно, отличие порядка реакции от единицы, характерной в ферментативном катализе для данной области концентраций субстрата, связано с отсутствием десорбции фермента с подложки в течение времени экспозиции системы при изучении кинетических параметров исследуемой реакции и вкладом силикагелевой матрицы в механизм каталитической реакции по сравнению с нативным ферментом [6]. Ранее было установлено, что в случае силикагеля, осажденного при рН=10, после выдерживания препарата иммобилизованного фермента в дистиллированной воде в течение 10 минут десорбция пероксидазы отсутствует, а 24-часовая экспозиция того же материала в дистиллированной воде показала десорбцию не более 10 % фермента, тогда как с силикагеля с рН осаждения 2 в аналогичных условиях десорбируется 70 % за первые 10 мин. экспозиции [6].

Таким образом, установлено, что при иммобилизации пероксидазы на водонерастворимой подложке морфология последней определяет механизм сорбции фермента и его степень связывания, а также каталитическую активность полученных ферментных препаратов.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. Выявлены зависимости кинетических параметров пероксидазного окисления гидрохинона от структурных характеристик силикагелевой матрицы и характера сорбции фермента на ней при иммобилизации.
2. Установлено, что иммобилизация пероксидазы на силикагелевой матрице методом физической сорбции повышает каталитическую активность фермента по сравнению с его нативной формой, но снижает избирательность относительно гидрохинона.

#### **Список литературы**

1. Чукин Г. Д. Химия поверхности и строение дисперсного кремнезема / Г. Д. Чукин. – М.: ООО «Принта», 2008. – 172 с.
2. Селибер Г. Л. Большой практикум по микробиологии / Г. Л. Селибер. – М.: Мир, 1962. – 492 с.
3. Рогожин В. В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов / В. В. Рогожин. – М.: ГИАРД, 2004. – С. 18.
4. Лурье Ю. Ю. Химический анализ производственных сточных вод / Ю. Ю. Лурье, А. И. Рыбникова. – М.: Химия, 1974. – С. 275–276.
5. Аралкин О. Л. Роль сорбционных взаимодействий фермент-силикагель в процессе получения пероксидазных катализаторов / О. Л. Аралкин, М. В. Биба, А. Н. Кунык, О. В. Вяткина // 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.

6. Вяткина О. В. Влияние природы подложки на механизм сорбции пероксидазы редьки черной / О. В. Вяткина // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. – 2012. – Т. 25 (64), № 4. – С. 239–247.
7. Вяткина О. Каталітична активність пероксидази редьки чорної щодо субстратів-відновників різної природи. / О. Вяткіна, І. Лаврентьєва, М. Єрмакова // Вісник Львівського національного університету. – 2012. – В. 53. – С. 357–362.
8. Атякшева Л. Ф. Адсорбция и каталитические свойства пероксидазы / Л. Ф. Атякшева, Р. А. Овсянников, Е. С. Чухрай [и др.] // Журнал физической химии. – 2011. – Т. 85, № 2. – С. 377–383.

**SUBSTRATE MORPHOLOGY INFLUENCE ON KINETICS OF  
HYDROQUINONE OXIDATION BY MEANS OF PEROXYDASE IN A SYSTEM  
WITH IMMOBILIZED ENZYME, EXTRACTED FROM ROOT CROP OF  
BLACK RADISH**

*Vyatkina O. V., Aralkina M. V., Aralkin O. L., Bazhin V. U., Proshina I. V.*

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

Wide use of peroxidase in science and technology is caused by a number of unique properties. However, the original peroxidase has significant drawbacks, namely: high sensitivity to external factors such as temperature and pH, as well as instability during storage. A solution of this problem is immobilization of the enzyme, i.e. attachment of the enzyme in active form to the insoluble base. Silica gel is used as such base. Its structure and properties depends on the pH of synthesis. The present work is devoted to study the influence of the structure of a silica gel base on the catalytic activity of immobilized peroxidase of black radish root relative to the substrate of the reducing agent hydroquinone. The kinetic parameters of the reaction of peroxidase oxidation of hydroquinone in systems with an enzyme immobilized on silica gels with different creation pH were studied. There were obtained enzyme preparations with height peroxidase activity relative to hydroquinone by the method of physical sorption in static conditions. It is shown that when peroxidase is immobilizing on a water-insoluble base, the base structure determines the mechanism of sorption of the enzyme and its degree of binding, and consequently, the catalytic activity of the resulting enzyme preparations. Herewith, increases the activity of the immobilized enzyme relative to hydroquinone, and decreases the selectivity because the parallel sorption of the substrate on the base is possible. It has been determined that peroxidase immobilized on silica gel synthesized at pH = 10 has maximal activity in the oxidation reaction of hydroquinone.

**Keywords:** peroxidase, immobilization, hydroquinone, kinetic parameters.

**References**

1. Chykin G. D. *Chemistry of surface and structure of silica*, 172 p. (Typography Paladin, "Printa", Moscow, 2008). (in Russ.).
2. Seliber G. L., *Major microbiology practical work*, 492 p. (Mir, Moscow, 1962). (in Russ.).

3. Rogojin V. V., *Peroxidase as a component of antioxidant system of living organisms*, 240 p. (GIARD, Moscow, 2004). (in Russ.).
4. Lurie Yu. Yu., *Chemical analysis of industrial wastewater*, 275–276 p. (Chemistry, Moscow, 1974) (in Russ.).
5. Aralkin O. L., Biba M. V., Куник А. Н., Vяткина О. В. Functional of sorptional coupling enzymatic-silica gel in a process of getting catalysts of peroxidase. Scientifically association students of 21-th centenary. *Natural sciences: Electronic collection of articles by materials of 30th international students correspondence of scientific and practical conference*, **4 (29)**, 166 (2015).
6. Vяткина О. В. Influence of nature of undercoat on mechanism sorption black radish peroxidase, *Scientifically note V. I. Vernadsky's Tavrida National University*, **25 (64), 4**, 239 (2012).
7. Vяткина О. В., Lavrienteva I., Ermakova M. Catalytic activity of black radish peroxides relatively of reduction substrates with different nature, *Scientific Messenger of Lviv national university*, **53**, 357 (2012).
8. Atyaksheva L. F., Ovsannikov R. A., Chuhrai E. S. [et al.] Adsorption and catalytic properties of peroxidase, *Russian Journal of Physical Chemistry*, **85, 2**, 377 (2011).