Т. 5. №12. 2019
DOI: 10.33619/2414-2948/49

УДК 66.094.3.098 https://doi.org/10.33619/2414-2948/49/06
AGRIS T01

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПОЛИМЕРО-ФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ПЕРОКСИДАЗЫ

©Лакина Н. В., *ORCID: 0000-0002-7293-8781, SPIN-код:3871-7341, канд. хим. наук, Тверской государственный технический университет г. Тверь, Россия, lakina@yandex.ru*
©Долуда В. Ю., *ORCID: 0000-0002-2865-9945, SPIN-код: 8836-6137, канд. хим. наук, Тверской государственный технический университет, г. Тверь, Россия, doludav@yandex.ru*
©Рабинович Г. Ю., *ORCID: 0000-0002-5060-6241, SPIN-код: 1437-3617, д-р. биол. наук, Всероссийский научно-исследовательский институт мелиорированных земель, п. Эммаусс, Россия, vniimz@list.ru*
©Лыса В. А., *ORCID: 0000-0002-4204-3143, Тверской государственный технический университет, г. Тверь, Россия, l-a-victoria@mail.ru*
©Паздерина Д. А., *ORCID: 0000-0002-7831-4275, Тверской государственный технический университет, г. Тверь, Россия, darya.pazderina@yandex.ru*

TO STUDY THE ACTIVITY OF THE POLYMER-ENZYME COMPLEXES ON THE BASIS OF PEROXIDASE

©Lakina N., *ORCID: 0000-0002-7293-8781, SPIN-code: 3871-7341, Ph.D., Tver State Technical University, Tver, Russia, lakina@yandex.ru*
©Doluda V., *ORCID: 0000-0002-2865-9945, SPIN-code: 8836-6137, Ph.D., Tver State Technical University, Tver, Russia, doludav@yandex.ru*
©Rabinovich G., *ORCID: 0000-0002-5060-6241, SPIN- code: 1437-3617, Dr. habil., All-Russian Research Institute of Reclaimed Lands, Emmauss, Russia, vniimz@list.ru*
©Lisa V., *ORCID: 0000-0002-4204-3143, Tver State Technical University, Tver, Russia, l-a-victoria@mail.ru*
©Pazderina D., *ORCID: 0000-0002-7831-4275, Tver State Technical University, Tver, Russia, darya.pazderina@yandex.ru*

Аннотация. Работа посвящена изучению способов иммобилизации пероксидазы (КФ 1.11.1.7) в полимерные матрицы ацетилцеллюлозы и полиакриламида, а также в гелевую структуру поливинилпиролидона. Для эффективности включения фермента в сетку полимера использовались модифицирующие агенты. такие как хитозан, глутаровый диальдегид. В качестве субстрата при изучении активности полученного иммобилизованного фермента использовали 2,2′-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты) диаммониевая соль (ABTS). Экспериментальные данные показали высокую активность фермента, включенного в матрицу поливинилпирролидона: степень связывания составила 85%, активность, выражаемая константой Михаэлиса Км=14×10^{-3} мМоль/л. Полученные результаты позволяют рекомендовать использование ферментов иммобилизованных в полимерные матрицы поливинилпирролидона, ацетилцеллюлозы, полиакрилоамида для создания высокочувствительных электродов.

Abstract. The work is devoted to the study of methods of immobilization of peroxidase (KF 1.11.1.7) in the polymer matrix of acetylcellulose and polyacrylamide, as well as in the gel structure of polyvinylpyrolidone. Modifying agents were used to efficiently incorporate the enzyme into the polymer grid. such as chitosan, glutaric dialdehyde. 2,2-Azino-bis-(3-ethylbenzthyosoline-6-sulfonic acids) diammonium salt (ABTS) was used as a substrate in the study of the activity of the immobilized enzyme obtained. Experimental data showed a high activity of the enzyme

Т. 5. №12. 2019
DOI: 10.33619/2414-2948/49

included in the matrix of polyvinylpyrrolidone: the degree of binding was 85%, the activity expressed by the Michaelis constant Km=14×10^{-3} mmol/L. The results obtained allow us to recommend the use of enzymes immobilized in polymer matrices of polyvinylpyrrolidone, acetylcellulose, polyacrylamide to create highly sensitive electrodes.

Ключевые слова: иммобилизованные ферменты, пероксидаза, поливинилпирролидон, ацетилцеллюлоза, полиакрилонитрил, модифицирующие агенты.

Keywords: immobilized enzymes, peroxidase, polyvinylpyrrolidone, acetylcellulose, polyacrylonitrile, modifying agents.

Введение

Создание высокоэффективных и стабильных ферментных систем является одним из главных направлений современной биотехнологии, основанной на катализе с применением иммобилизованных ферментов. Сегодня с их помощью уже производятся в больших количествах многие биологически активные вещества.

Очень важным является налаживание сотрудничества представителей разных специальностей: биотехнологов, биохимиков, а также представителей полимерной химии. Актуальным является подбор оптимальных носителей для определенной цели, для определенного фермента, создавать такие носители, которые будут служить не просто опорой для фермента, но и могли бы выполнять за него часть его работы, например, концентрировать субстрат в непосредственной близости от его активного центра [1–2].

Широкое распространение получил метод включения ферментов и клеток в полиакриламидный гель, имеющий жесткую пространственную сетчатую структуру. Полиакриламидный гель устойчив к химическим воздействиям. Очень интересную группу представляют полиамидные носители. Это группы различных гетероцепных полимеров с повторяющейся амидной группой -C(O)-NH-.

Вторичная ацетилцеллюлоза имеет возможность использования в качестве полимера-носителя для лекарственных веществ с целью пролонгирования их действия. Вторичная ацетилцеллюлоза получается как продукт частичного омыления триацетатцеллюлозы и содержит больше свободных гидрофильных групп, характеризуется более высокой гидрофильностью, большей возможностью образовывать различные межмолекулярные связи с другими ингредиентами. Водные растворы вторичной ацетилцеллюлозы в концентрации 5–7% имеют вид эластичного геля, который легко разбавляется водой [3].

Природные полисахариды наиболее часто используют для формирования нековалентных комплексов биокатализатор–полимер. Хитозан является простейшим производным хитина, природного соединения из группы полисахаридов; основного компонента наружного скелета (кутикулы) членистоногих и ряда других беспозвоночных, входящего также в состав клеточной стенки грибов и бактерий [4].

Данная работа посвящена изучению эффективности способов включения окислительно–восстановительного фермента пероксидазы в гелевую матрицу поливинилпиролидона (ПВП), а также в полимерные матрицы ацетилцеллюлозы (АЦТ) и полиакриламида (ПАН). Химическая структура изучаемых полимерных носителей представлена на Рисунке 1.

Пероксидаза — оксидоредуктаза (КФ 1.11.1.7) способна катализировать реакции оксидазного, пероксидазного и оксигеназного окисления субстратов. Является двухкомпонентным ферментом, представляющим собой сочетание активной группы,

Т. 5. №12. 2019
DOI: 10.33619/2414-2948/49

вступающей в химическое взаимодействие с субстратами, и коллоидального белкового «носителя», усиливающего каталитическое действие этой группы.

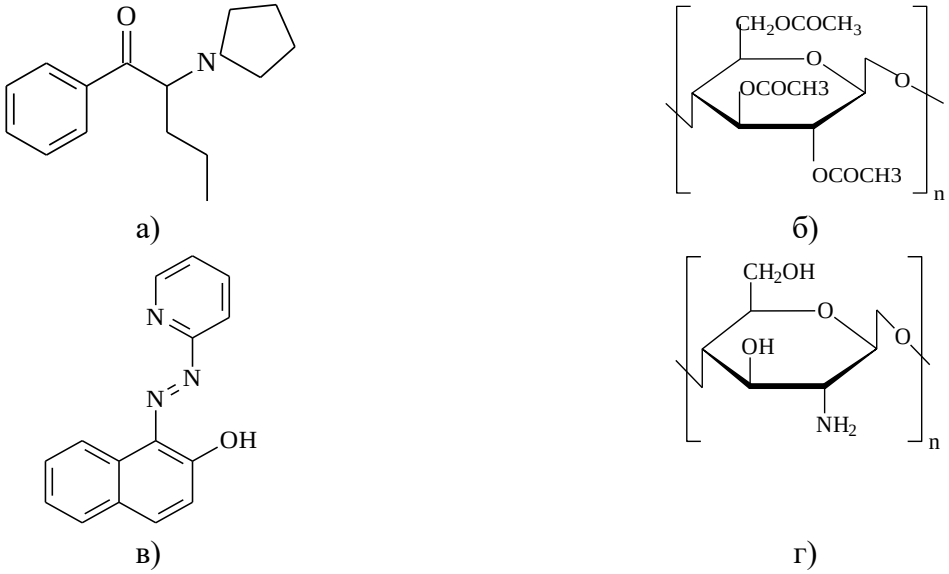

Рисунок 1. Химическое строение полимерных матриц где: а) поливинилпирролидон (ПВП); б) ацетилцеллюлоза (АЦТ); в) полиакрилонитрил(ПАН); г) модифицирующий агент хитозан.

Не обладая специфичностью в реакциях индивидуального пероксидазного окисления, фермент способен приобретать избирательность в реакциях совместного окисления субстратов. Хотя участие фермента в оксигеназных реакциях мало исследовано. В качестве субстрата, для изучения активности иммобилизованной пероксидазы в полимерную матрицу использовалась реакция окисления 2,2-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты) диаммониевая соль (ABTS) окисления H_2O_2 [6–7].

Химическая реакция окисления ABTS пероксидом водорода представлена на Рисунке 2.

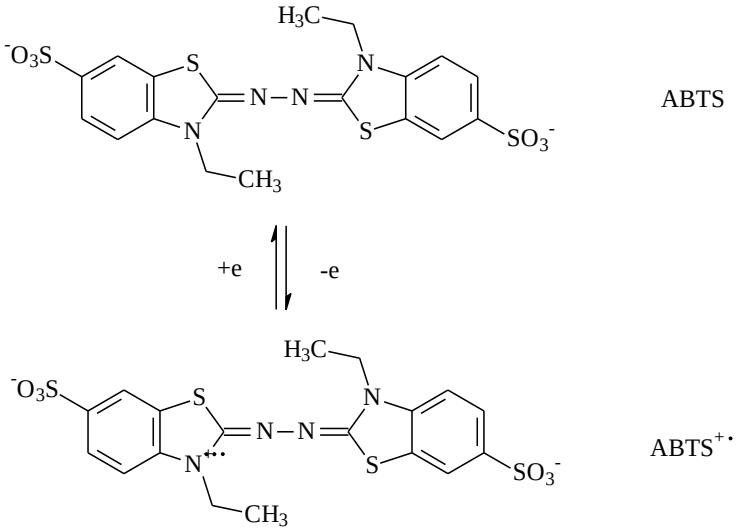

Рисунок 2. Химическая реакция окисления ABTS в присутствии фермента пероксидом водорода.

Материал и методы исследования

Материалы. Поливинилпирролидон (ПВП) (чда, марка 11/2, сорт 1 ГОСТ 10779-78), хитозан (чда, «Реахим»), уксусная кислота (чда, «Реахим»), глутаровый диальдегид (Glu), (чда, Sigma), NaOH (хч, «Реахим»), очищенная пероксидаза (КФ 1.11.07) с активностью 150 ед/мг (“Sigma”), $C_{18}H_{24}N_6S_4$ 2,2-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты)

Т. 5. №12. 2019
DOI: 10.33619/2414-2948/49

диаммониевая соль (ABTS) (чда, BioChemica), Ацетилцеллюлоза (АЦТ) (хч, BioChemica), Полиакрилонитрил (ПАН) (хч, Aldrich), глицерин (хч, Aldrich), полиэтиленгликоль (хч, «Реахим»).

Методы синтеза полимерных матриц. Гель ПВП. К 10,0 г 40%-ного водного раствора ПВП добавляется 10,0 г 2%-ного водного раствора хитозана. Смесь перемешивают в течение одной минуты до гелеобразного состояния. Гель при помещении в среду с избытком воды или соли при комнатной температуре абсорбирует дополнительную жидкость, но не растворяется и не разрушается. К 10 мл полученного геля добавляем 1 мл глутарового диальдегида (Glu) 0,1% и перемешиваем с помощью магнитной мешалки в течение 6 ч. Из полученного полимерного геля готовим пленку толщиной 1 мм. Высушиваем на воздухе, затем добавляем ацетатный буферный раствор фермента пероксидазы (0,01 г/л) и выдерживаем в течение 12 ч. Тщательно промываем буферным раствором до отсутствия реакции на нингидрин, свидетельствующей о наличии белка в растворе. Исследуемый образец фермента обозначаем в работе ПВП/Хит/Glu/Пероксидаза.

Ацетилцеллюлозная пленка. 1 г ацетилцеллюлозы растворяем в 20 мл полиэтиленгликоля в течение 24 ч при t=60 °C, в качестве нерастворителя (осадителя) используем глицерин в объеме 30 мл. Смесь охлаждаем, фильтруем, из полученного полимерного геля формируем пленку толщиной 1 мм. Полученную ацетилцеллюлозную пленку пропитываем раствором хитозана 2% в течении 6 ч, промываем дистиллированной водой, высушиваем. Затем полученную полимерную матрицу выдерживаем в растворе глутарового диальдегида (Glu) 0,1%, обьемом 50 мл, в течение 6 часов, тщательно промываем и высушиваем на воздухе. Полученную модифированную полимерную матрицу выдерживаем в течение 12 ч в 100 мл ацетатного буферного раствора фермента пероксидазы (0,01 г/л). Тщательно промываем буферным раствором до отсутствия реакции на нингидрин, свидетельствующей о наличии белка в растворе. Таким образом, получаем иммобилизованный фермент в матрице АЦТ. Исследуемый образец фермента обозначаем в работе АЦТ/Хит/Glu/Пероксидаза.

Полиакрилонитрил. 1 г полиакрилонитрила нагреваем до полного расплавления при t=90 °C, из полученного полимерного геля формируем пленку толщиной 1 мм, высушиваем на воздухе. Далее проводим все стадии модификации, как и при получении АЦТ/Хит/Glu/Пероксидаза. Исследуемый образец фермента обозначаем в работе ПАН/Хит/Glu/Пероксидаза.

Определение активности иммобилизованного фермента. Реакционная смесь содержала 0,36 мМ ABTS и 5 мМ H_2O_2 в 0,1 М Na-ацетатном буфере (pH 4,5). Скорость реакции определяли по изменению поглощения при 405 нм, используя коэффициент экстинкции окисленного ABTS 36,8 $мМ^{-1}см^{-1}$ [6].

Измерения проводили при 25 °C на спектрофотометре UV-2401 фирмы Shimadzu (Япония). Единицу ферментативной активности (Е) определяли как количество фермента, необходимого для превращения 1 мкмоль субстрата за 1 мин при описанных условиях измерения. Измерения активности проводили не менее, чем в трех повторах.

Результаты и обсуждение

Полученные данные представлены на Рисунке 3. Активность пероксидазы уменьшалась не значительно, после ее иммобилизации в полимерную матрицу.

Кривую можно разбить на два участка: участок, на котором согласно закону действующих масс скорость реакции пропорциональна концентрации реагирующих веществ, и участок, на котором скорость реакции не зависит от концентрации субстрата, она постоянна и максимальна.

Т. 5. №12. 2019
DOI: 10.33619/2414-2948/49

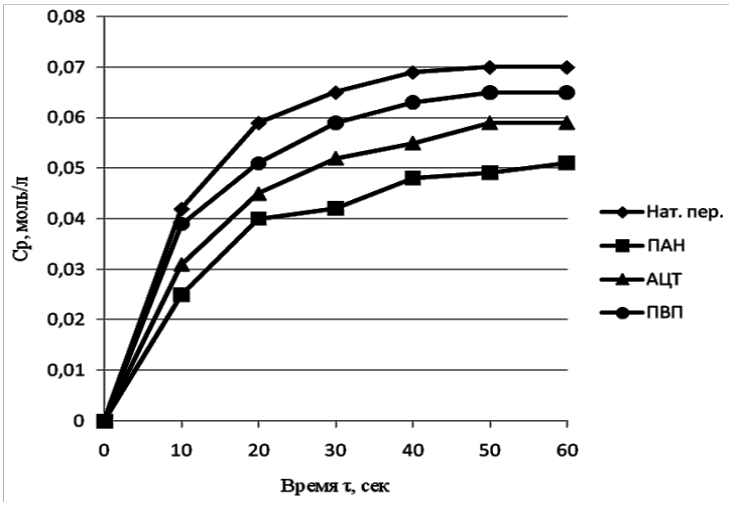

Рисунок 3. Сравнение активности иммобилизованной пероксидазы в полимерные матрицы.

Числовое значение субстрата, при котором скорость реакции равна половине максимальной скорости, называется константой Михаэлиса (Км). Константа Михаэлиса имеет большое значение при исследовании ферментов; она является весьма важным параметром, характеризующим, в частности, степень сродства фермента к субстрату.

Расчет начальных скоростей реакции при различных концентрациях фенола используется в кинетике ферментативного катализа, так как начальная фаза реакции наиболее полно характеризует ее протекание из-за отсутствия возможного ингибирования

Из экспериментальных данных видно, что наиболее эффективно работающий [7]. катализатор — ПВП/Хитозан/Glu/Пероксидаза (по сравнению с нативной пероксидазой). Для всех образцов были рассчитаны кинетические параметры ферментативной реакции W_{max}и K_m (Таблица). Полученные данные представлены в виде диаграммы на Рисунке 4.

Таблица.

СРАВНЕНИЕ ЗНАЧЕНИЙ ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ
И КОЛИЧЕСТВА, ВКЛЮЧЕННОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ В ПОЛИМЕРНУЮ МАТРИЦУ

№	*Образец*	*$W_{max} \times 10^{-6}$, Моль/(л×с)*	*$K_m \times 10^{-3}$, мМоль/л*	*Количество пероксидазы, %*
1	Нативная пероксидаза	2,1	18	100
2	ПВП/Хитозан/Glu/Пероксидаза	2,4	14	85
3	АЦТ/Хитозан/Glu/Пероксидаза	2,0	9,6	46
4	PAN/Хитозан/Glu/Пероксидаза	0,9	5,6	26

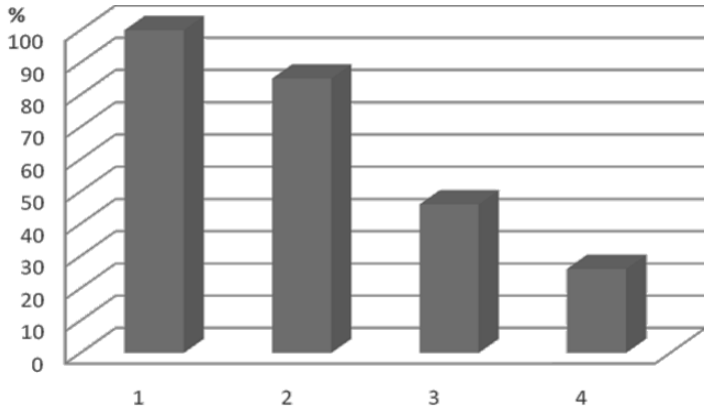

Рисунок 4. Зависимость количества степени иммобилизованной пероксидазы от вида полимерной матрицы, где: 1) нативная пероксидаза; 2) ПВП; 3) АЦТ; 4) ПАН.

Т. 5. №12. 2019
DOI: 10.33619/2414-2948/49

Из диаграммы видно, что наиболее эффективной биокаталитической системой является система, приготовленная с использованием ПВП, так как в данной системе иммобилизация пероксидазы прошла более успешно. Это можно объяснить наибольшим количеством доступных для субстрата активных центров фермента, которое определяется степенью приемлемости структурной решетки и окружением функциональных групп для удержания фермента в полимерной матрице ПВП в отличие от матриц АЦТ и ПАН.

Заключение

При формировании геля в растворе, содержащем фермент, последний захватывается в образующийся гелевый носитель. Контролируя степень сшивки геля, этот метод можно использовать для любого фермента, поскольку в геле белковые молекулы удерживаются трехмерной решеткой.

Для более эффективной иммобилизации необходимо применять ковалентное связывание фермента с полимерным носителем. Большим преимуществом ковалентного связывания является незначительность утечки фермента из матрицы, выбираемой с учетом оптимальной пористости, биологической устойчивости. Разнообразие методов связывания позволяет не затрагивать активный центр фермента в процессе связывания.

В работе исследован метод эффективного ковалентного связывания пероксидазы с использованием хитозана и глутарового диальдегида в полимерные матрицы. Наиболее активные образцы иммобилизованных в полимерную матрицу ферментов можно успешно применять для изготовления высокочувствительных биоэлектродов, используемых в медицинской промышленности, биофарманализе, а также для усовершенствования биотопливных элементов в энергосберегающих технологиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 19-08-00186).

Список литературы:

1. Shleev S., Tkac J., Christenson A., Ruzgas T., Yaropolov A. I., Whittaker J. W., Gorton L. Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes // Biosensors and Bioelectronics. 2005. V. 20. №12. P. 2517-2554. https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.10.003

2. Kang Z., Jiao K., Xu X., Peng R., Jiao S., Hu Z. Graphene oxide-supported carbon nanofiber-like network derived from polyaniline: A novel composite for enhanced glucose oxidase bioelectrode performance // Biosensors and Bioelectronics. 2017. V. 96. P. 367-372. https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.05.025

3. Kang, Z., Jiao, K., Cheng, J., Peng, R., Jiao, S., & Hu, Z. A novel three-dimensional carbonized PANI1600@ CNTs network for enhanced enzymatic biofuel cell // Biosensors and Bioelectronics. 2018. V. 101. P. 60-65. https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.008

4. Atykyan N., Kadimaliev D., Revin V., Levina E. Isolation, Purification, and Investigation of Some Properties of Glucose Oxidase of the Wood-Degrading Fungus *Lentinus (Panus) tigrinus* Strain VKM F-3616D // BioResources. 2018. V. 13. №3. P. 5554-5568.

5. Rao P. R., Kavya P. Production, isolation and purification of peroxidase using Bacillus subtilis // Int Cong Environ Biotechnol Chem Eng. 2014. V. 64. P. 21-27. https://doi.org/10.7763/IPCBEE

6. Chung Y., Tannia D. C., Kwon Y. Glucose biofuel cells using bi-enzyme catalysts including glucose oxidase, horseradish peroxidase and terephthalaldehyde crosslinker // Chemical Engineering Journal. 2018. V. 334. P. 1085-1092. https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.121

Т. 5. №12. 2019
DOI: 10.33619/2414-2948/49

7. Kang Z., Jiao K., Xu X., Peng R., Jiao S., Hu Z. Graphene oxide-supported carbon nanofiber-like network derived from polyaniline: A novel composite for enhanced glucose oxidase bioelectrode performance // Biosensors and Bioelectronics. 2017. V. 96. P. 367-372. https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.05.025

References:

1. Shleev, S., Tkac, J., Christenson, A., Ruzgas, T., Yaropolov, A. I., Whittaker, J. W., & Gorton, L. (2005). Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. *Biosensors and Bioelectronics, 20*(12), 2517-2554. https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.10.003

2. Kang, Z., Jiao, K., Xu, X., Peng, R., Jiao, S., & Hu, Z. (2017). Graphene oxide-supported carbon nanofiber-like network derived from polyaniline: A novel composite for enhanced glucose oxidase bioelectrode performance. *Biosensors and Bioelectronics, 96,* 367-372. https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.05.025

3. Kang, Z., Jiao, K., Cheng, J., Peng, R., Jiao, S., & Hu, Z. (2018). A novel three-dimensional carbonized PANI1600@ CNTs network for enhanced enzymatic biofuel cell. *Biosensors and Bioelectronics*, 101, 60-65. https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.008

4. Atykyan, N., Kadimaliev, D., Revin, V., & Levina, E. (2018). Isolation, Purification, and Investigation of Some Properties of Glucose Oxidase of the Wood-Degrading Fungus *Lentinus (Panus) tigrinus* Strain VKM F-3616D. *BioResources, 13*(3), 5554-5568.

5. Rao, P. R., & Kavya, P. (2014). Production, isolation and purification of peroxidase using Bacillus subtilis. *Int Cong Environ Biotechnol Chem Eng, 64*, 21-27. https://doi.org/10.7763/IPCBEE

6. Chung, Y., Tannia, D. C., & Kwon, Y. (2018). Glucose biofuel cells using bi-enzyme catalysts including glucose oxidase, horseradish peroxidase and terephthalaldehyde crosslinker. *Chemical Engineering Journal, 334*, 1085-1092. https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.121

7. Kang, Z., Jiao, K., Xu, X., Peng, R., Jiao, S., & Hu, Z. (2017). Graphene oxide-supported carbon nanofiber-like network derived from polyaniline: A novel composite for enhanced glucose oxidase bioelectrode performance. *Biosensors and Bioelectronics, 96,* 367-372. https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.05.025

Работа поступила
в редакцию 20.11.2019 г.

Принята к публикации
25.11.2019 г.

Ссылка для цитирования:

Лакина Н. В., Долуда В. Ю., Рабинович Г. Ю., Лыса В. А., Паздерина Д. А. Изучение активности полимеро-ферментных комплексов на основе пероксидазы // Бюллетень науки и практики. 2019. Т. 5. №12. С. 54-60. https://doi.org/10.33619/2414-2948/49/06

Cite as (APA):

Lakina, N., Doluda, V., Rabinovich, G., Lisa, V., & Pazderina, D. (2019). To study the Activity of the Polymer-enzyme Complexes on the Basis of Peroxidase. *Bulletin of Science and Practice, 5*(12), 54-60. https://doi.org/10.33619/2414-2948/49/06 (in Russian).