

УДК 547.565.2: 577.158

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ОКСИДОРЕДУКТАЗ

Б.Б. Тихонов, П.Ю. Стадольникова, А.И. Сидоров, Н.В. Лакина

Тверской государственной технической университет
Кафедра биотехнологии и химии

Изучены свойства ферментативных систем на основе двух ферментов класса оксидоредуктаз (пероксидазы хрена и глюкозооксидазы) в реакции окисления *o*-дианизидина. Процесс основан на окислении глюкозооксидазой β -D-глюкозы в присутствии кислорода до β -D-глюконо- δ -лактона и H_2O_2 и использовании последней для окисления *o*-дианизидина. Доказана возможность ковалентной иммобилизации данной мультиферментной системы на ионообменных смолах.

Ключевые слова: оксидоредуктазы, пероксидаза хрена, глюкозооксидаза, мультиферментная система, глюкоза, *o*-дианизидин, иммобилизация.

Ароматические соединения относятся к классу наиболее опасных загрязнителей водных ресурсов [1]. Ситуация осложняется тем, что эта группа веществ очень широко используется в различных отраслях промышленности. Эти факты делают проблему утилизации (в том числе удаления его из промышленных стоков) ароматических соединений достаточно острой и актуальной. Задача удаления органических загрязнителей из промышленных стоков в настоящее время полностью не решена [2]. Перспективным направлением исследований в этой сфере является использование катализаторов на основе иммобилизованных ферментов, способных переводить производные фенола и бензола в менее опасные полимерные продукты, выпадающие в осадок, что делает возможным их удаление из реакционной среды простым фильтрованием [3]. Широко востребованными являются ферменты, относящиеся к классу оксидоредуктаз, прежде всего пероксидаза и глюкозооксидаза. Пероксидаза хрена (ЕС 1.11.1.7) – гем-содержащий фермент, катализирующий окисление большинства фенольных и других ароматических соединений в присутствии перекиси водорода [4]. Глюкозооксидаза (ЕС 1.1.3.4) – флавопротеин, который катализирует окисление β -D-глюкозы и широко используется в различных сферах (биосенсоры, пищевой консервант и стабилизатор цвета и т.д.) [5]. Сопряженные ферментные системы на основе этих двух ферментов находят широкое применение в различных процессах, прежде всего – в анализе различных жидкостей (в том числе биологических) [5].

Целью данного исследования было изучение свойств мультиферментных систем на основе пероксидазы хрена и глюкозооксидазы.

Методы и методики

Реактивы

В работе использовали следующие компоненты (в скобках – условное обозначение). Пероксидаза хрена (HRP) была получена из сердцевины корня хрена обыкновенного (*Armoracia rusticana*). Источником глюкозооксидазы (GOX) был препарат Multifect® GO 1500L (Genencor, A Danisco Division). Субстраты для исследования кинетики: о-дианизидин (прочный синий В, $C_{14}H_{16}N_2O_2$; Sigma); глюкоза ($C_6H_{12}O_6$; Fluka); фосфатные буферные растворы на основе KH_2PO_4 и NaOH (pH=6,0 и pH=7,0); перекись водорода (ООО «Росбио», 3%-й раствор). Для иммобилизации HRP и GOX в качестве носителя использовались ионообменные смолы КУ 2-8 (ГОСТ 20298-74, размер зерен – 0.315 – 1.25 мм) и Dowex 50WX2 (Na^+ -форма; 50-100 mesh; Fluka); модификатором являлся хитозан кислоторастворимый средней вязкости (400 кДа, Fluka); активирующий агент – глутаровый диальдегид ($C_5H_8O_2$; Astos organics; 25%-ый раствор).

Оборудование и приборы

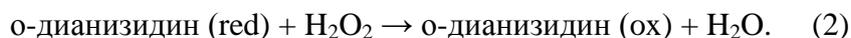
Изучение кинетики осуществлялось в термостатируемом реакторе периодического действия с возвратно-поступательным качанием. Оптическая плотность реакционной смеси измерялась на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ «Спектр»). Для центрифугирования использовалась центрифуга ОПн-8УХЛ4.2.

Схема процесса

Мультиферментная система HRP-GOX

Система на основе двух ферментов пероксидазы хрена и глюкозооксидазы классическая сопряженная ферментная система, находящая применение в многочисленных аналитических приложениях. Многие исследователи используют аналитический метод, который базируется на принципе, что глюкозооксидаза окисляет β -D-глюкозу в присутствии кислорода до β -D-глюконо- δ -лактона и H_2O_2 [6]. Образовавшаяся перекись затем используется для окисления хромогенного субстрата в присутствии пероксидазы с образованием различных окрашенных продуктов, содержание которых определяется спектрофотометрически. В данной работе в качестве субстрата используется о-дианизидин, образующий под воздействием

пероксидазы хрена коричневые окисленные продукты, регистрируемые при длине волны 460 нм:



Пероксидаза хрена (HRP) была получена по известной методике из сердцевины корня хрена обыкновенного (*Armoracia rusticana*) [7].

Совместная иммобилизация глюкозооксидазы и пероксидазы проводилась на полимерных носителях – ионообменных смолах КУ-2-8 и Dowex. Иммобилизация проводилась двумя различными путями: адсорбционно (физический метод) и при помощи ковалентной сшивки (химический метод). При проведении иммобилизации методом физической адсорбции биферментная система (HRP, GOX) наносилась непосредственно на носитель (Dowex, КУ-2-8). Для иммобилизации химическим методом на носитель (Dowex, КУ-2-8) последовательно наносились хитозан, глутаровый диальдегид и биферментная система (HRP, GOX).

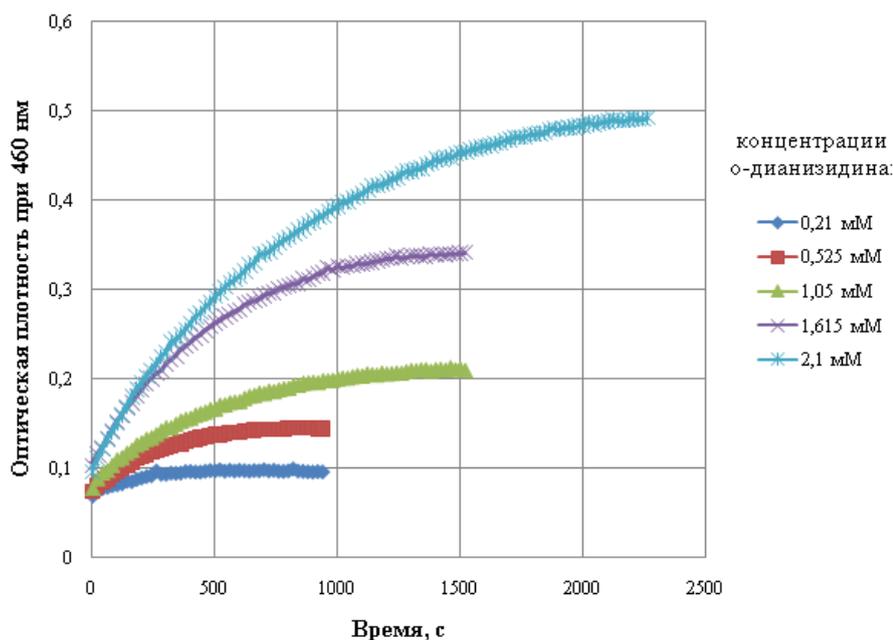
Методика проведения кинетических экспериментов

Реакции с нативными ферментами проводились в кювете спектрофотометра СФ-2000. Ход реакции наблюдался по увеличению оптической плотности реакционной смеси при $\lambda = 460$ нм (раствор сравнения – вода). Для изучения влияния pH на активность биферментной системы для приготовления раствора глюкозы использовались буферные растворы с различными значениями pH (1,68; 4,01; 6,0; 7,0; 9,18; 12,43). Изучение влияния температуры и активности иммобилизованной биферментной системы проводилось в термостатируемом реакторе. Первичные экспериментальные данные – зависимость оптической плотности реакционной смеси от времени – были пересчитаны в зависимости концентрации субстрата от времени по молярным коэффициентам поглощения согласно закону Бугера–Ламберта–Бера [8]. Константа Михаэлиса (K_M) и предельная скорость реакции окисления (V_m) были определены с помощью метода двойных обратных координат по начальной скорости реакции (V_0) при варьировании начальных концентраций о-дианизидина (C_0) [9].

Результаты и обсуждение

Результаты, полученные в ходе варьирования начальной концентрации о-дианизидина в системе HRP-GOX-о-дианизидин-глюкоза, иллюстрирует рис. 1.

По результатам данных экспериментов с помощью метода Лайнуивера–Берка были найдены кинетические параметры реакции. Полученные значения V_m и K_M для системы HRP-GOX-о-дианизидин-глюкоза были сравнены со значениями, полученными в системе HRP-о-дианизидин- H_2O_2 (таблица).



Р и с . 1. Ход реакции в системе HRP-GOX-о-дианизидин-глюкоза при различных начальных концентрациях о-дианизидина ($t = 25^\circ\text{C}$)

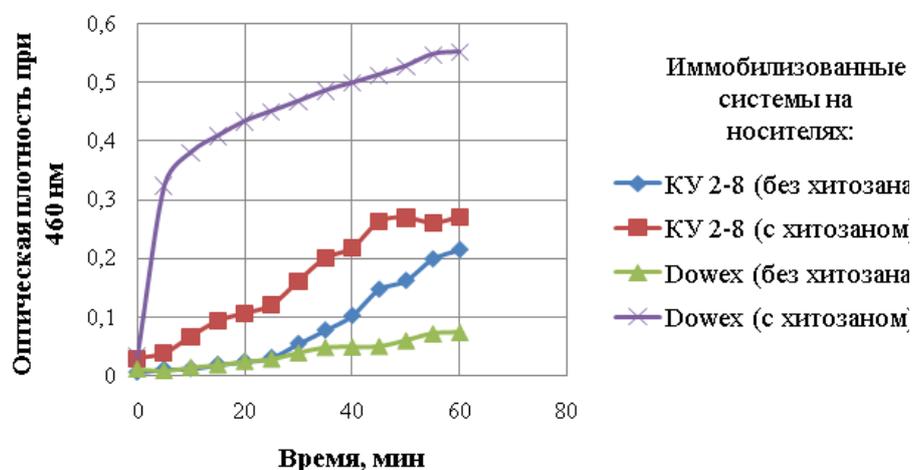
Кинетические параметры синтезированных катализаторов

| Кинетический параметр | Каталитические системы | |
|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| | HRP- H_2O_2 - о-дианизидин | HRP-GOX- о-дианизидин- глюкоза |
| V_m , ммоль/л·с, $\cdot 10^3$ | 0.38 | 0.10 |
| K_M , ммоль/л | 0.05 | 0.02 |

Из таблицы видно, что кинетические характеристики исследуемой системы HRP-GOX-о-дианизидин-глюкоза несколько хуже, чем у системы HRP-H₂O₂-о-дианизидин. Этот факт может быть объяснен многостадийностью процесса, а также недостаточно быстрым образованием H₂O₂ в реакции β-D-глюкозы до D-глюконо-δ-лактона, которая является лимитирующей стадией процесса.

Также было выявлено, что оптимальное значение pH для системы HRP-GOX-о-дианизидин-глюкоза – pH = 6.0. Результаты температурных экспериментов показали, что оптимальной для проведения ферментативной реакции является температура 25 °С.

Результаты исследования процесса иммобилизации биферментной системы приведены на рис. 2.



Р и с . 2. Ход реакции окисления о-дианизида при различных температурах в системе HRP-GOX-о-дианизидин-глюкоза при различных методах иммобилизации

Из рисунка видно, что системы, полученные нековалентной иммобилизацией, демонстрируют более низкую каталитическую активность и стабильность вследствие непрочного связывания фермента с носителем и последующего его диффундирования в раствор. Наилучший результат показала ферментная система на носителе Dowex, модифицированном хитозаном.

Выводы

Таким образом, в ходе экспериментов были исследованы свойства биферментной системы на основе пероксидазы хрена и

глюкозооксидазы. Выявлено, что оптимальное значение pH для системы HRP-GOX-о-дианизидин-глюкоза – pH = 6.0, оптимальная температура 25°C. Доказана возможность ковалентной иммобилизации данной мультиферментной системы на ионообменных смолах (КУ 2-8 и Dowex 50WX2).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 15-08-00535 и 14.08-01218).

Список литературы

- 1 Гурвич Я.А., Кумок М. Химия и технология промежуточных продуктов и органических красителей. М.: Высшая школа. 1968. 360 с.
- 2 Wilberg K.Q., Nunes D.G., Rubio J. // Braz. J. of Chem. Eng. 2000. V. 17. P. 4–7.
- 3 Karam J. Nicell J.A. // J. Chem. Tech. Biotechnol. 1997. V. 69. P. 141–153.
- 4 Глазова Н.В., Серкова А.Н. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2013. Т. 13. вып. 3. С. 377–384.
- 5 Bankar S.B., Bule M.V., Singhal R.S., Ananthanarayan L. // Biotechnology Advances. 2009. № 27. P. 489–501.
- 6 Wilson R., Turner A.P.F. // Biosensors and Bioelectronics. 1992. № 7. P. 165–185.
- 7 Тихонов Б.Б., Сидоров А.И., Сульман Э.М. // Катализ в промышленности. 2007. № 3. С. 48–50.
- 8 Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. М.: «Академия». 2005. 480 с.
- 9 Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В. и др. Биотех. 7: Иммобилизованные ферменты М.: Высш. шк. 1987. 159 с.

INVESTIGATION OF MULTIENZYME SYSTEMS BASED ON GLUCOSE OXIDASE AND HORSERADISH PEROXIDASE

B.B. Tikhonov, P.Yu. Stadolnikova, A.I. Sidorov, N.V. Lakina

Tver State Technical University
Department of Biotechnology and Chemistry

In this article the properties of the enzymatic systems on the basis of two enzymes of a class of oxidoreductases (horseradish peroxidase and glucose oxydase) in the reaction of an o-dianizidine oxidation are investigated. Process is based on β -D-glucose oxidation in the presence of oxygen to β -D-glucono- δ -lactone and H_2O_2 by glucose oxydase and with use of the last for the oxidation of o-dianizidine (with forming of the

painted products). Possibility of a covalent immobilization of this multienzymatic system on ion-exchangers is proved.

Keywords: horseradish peroxidase, glucose oxidase, multienzymatic system, glucose, o-dianisidine, immobilization

Об авторах:

ТИХОНОВ Борис Борисович – кандидат химических наук, доцент, кафедра Стандартизации, сертификации и управления качеством, Тверской государственный технический университет, tiboris@yandex.ru, science@science.tver.ru

СТАДОЛЬНИКОВА Полина Юрьевна – студентка магистратуры химико-технологического факультета, Тверской государственный технический университет, science@science.tver.ru

СИДОРОВ Александр Иванович – кандидат химических наук, профессор, кафедра биотехнологии и химии, Тверской государственный технический университет, science@science.tver.ru

ЛАКИНА Наталья Валерьевна - кандидат химических наук, доцент, кафедра биотехнологии и химии, Тверской государственный технический университет, science@science.tver.ru