

## БИОХИМИЯ

УДК 541.647.577.1

### ИММОБИЛИЗАЦИЯ О-ДИФЕНОЛОКСИДАЗЫ ЛЬНА

П.С. Лихуша, Г.П. Лапина

Тверской государственной университет, Тверь

В данной работе рассматриваются иммобилизация о-ДФО на твёрдом носителе в оптимальных условиях, разработанных на предыдущих этапах (Лихуша, Лапина, 2009; Лапина, Лихуша, 2010) исследования, а также ферментативные параметры иммобилизованной о-ДФО льна. В качестве носителя для иммобилизации энзима использованы фильтровальная бумага и пластинки «Sorbfil».

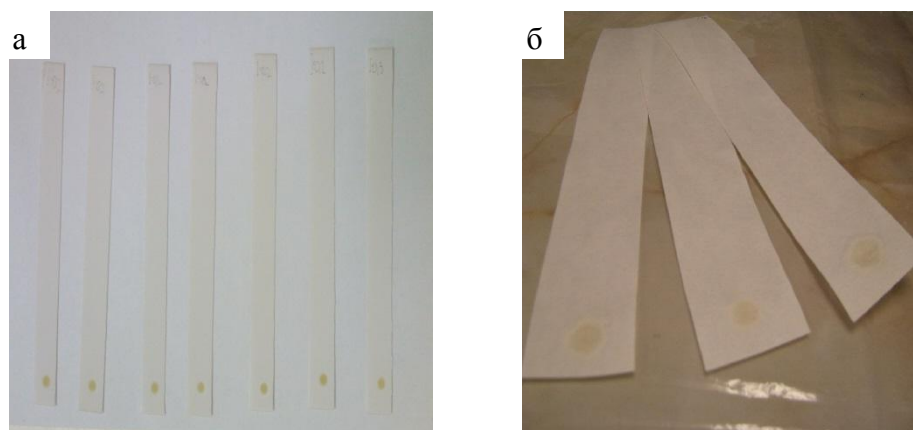
**Ключевые слова:** о-дифенолоксидаза (о-ДФО) биотканей льна, бензидин, константа Михаэлиса ( $K_M$ ), константа каталитическая ( $k_{кат}$ ), максимальная скорость ( $V_{max}$ ), иммобилизация.

**Введение.** Иммобилизация – это процесс прикрепления ферментов к поверхности природных или синтетических материалов, включение их в полимерные материалы, полые волокна и мембранные капсулы, поперечная химическая сшивка. При иммобилизации ферментов происходит стабилизация каталитической активности, т.к. этот процесс препятствует денатурации белков (Кестнер, 1974; Тривен, 1983; Волова, 1999). Сравнительное исследование фермента о-ДФО биотканей льна в растворе и иммобилизованном состоянии важно, поскольку позволит не только получить новые сведения о его биокаталитических свойствах, но и расширить теоретические представления о взаимосвязи структуры и функций ферментов, осуществляющих биокатализ в объеме водной фазы и на поверхности раздела (в иммобилизованном состоянии). Помимо этого, иммобилизованную форму фермента можно использовать для создания тест-систем для определения перекисных соединений в продуктах питания, в частности, в льняном масле.

**Методика.** На две полоски фильтровальной бумаги наносили 10 капель САЧ (сывороточный альбумин человека – коммерческий препарат: концентрация  $2,2 \cdot 10^{-5}$  М, сухое вещество содержит не более 6% воды по массе), 20 капель экстракта о-ДФО ( $5,13 \cdot 10^{-5}$  М) и дополнительно 10 капель раствора бензидина ( $1,08 \cdot 10^{-3}$  М). Капли наносили поочередно с последующим высушиванием. Диаметр пятен от капель составил 4-6 мм во всех вариантах нанесения компонентов. Аналогичная методика была применена и для пластин «Sorbfil». Растворы пероксида водорода готовили разбавлением исходного ( $2,283 \cdot 10^{-2}$  М). Концентрация разбавленного раствора составляла

$1,083 \cdot 10^{-2}$  М, т.е. на три порядка больше концентрации фермента.

Вслед за этим проводили погружение иммобилизованных форм о-ДФО в растворы  $H_2O_2$ . При окислении бензидина образовывалось восстановленное соединение синего цвета, количество которого определяли фотометрически при  $\lambda=540$  нм. Затем проводили просушивание и сканирование, с последующим сравнением интенсивности окрашенных зон. Чем больше концентрация пероксида водорода (в интервале  $(1,083 - 2,283) \cdot 10^{-2}$  М), тем интенсивнее была окраска пятен. Интенсивность окраски демонстрировала успешность иммобилизации; реакция с участием фермента о-ДФО шла как в объёме водного раствора, так и на твердом носителе, на котором был иммобилизован фермент. При большей концентрации перекиси водорода ферментативная реакция протекала интенсивнее с увеличенным выходом продуктов. Наиболее оптимальным твёрдым носителем были выбраны пластинки «Sorbfil».



Р и с . 1 . Внешний вид тестовых систем иммобилизованной о-дифенолоксидазы льна на пластинках «Sorbfil» (а) и фильтровальной бумаге (б)

По разработанной схеме в условиях стационарной кинетики и насыщения фермента субстратом были получены кинетические кривые D-т при ионных силах  $0,1 \div 0,4$  М и проведены расчёты ферментативных параметров  $k_{kat}$  и  $K_M$ . Затем были построены зависимости  $k_{kat}$  и  $K_M$  от ионной силы раствора (I) для сравнения ферментативного поведения иммобилизованного биокатализатора и свободной формы фермента.

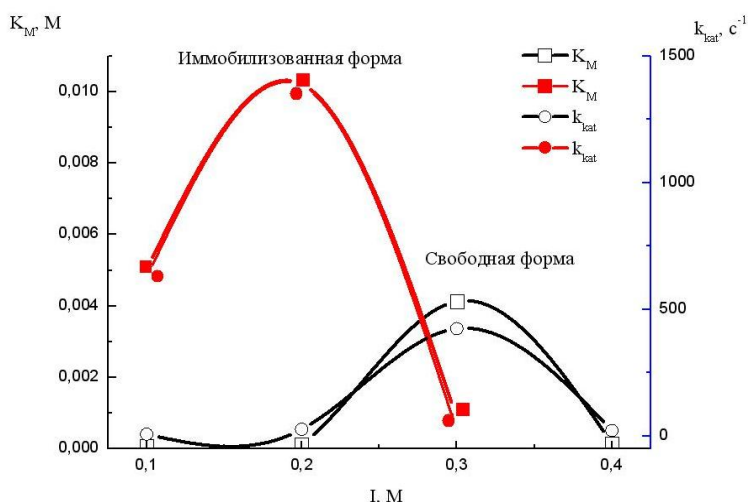


Рис. 2. Зависимость  $K_M$  и  $k_{cat}$  от ионной силы (I) раствора

**Результаты и обсуждение.** Из рис. 2 видно, что при повышении ионной силы до 0,2 М, одновременно возрастают и  $K_M$ , и  $k_{cat}$  (для иммобилизованной формы). При дальнейшем повышении ионной (M) силы от 0,2 до 0,3 наблюдается снижение указанных значений. Из графика видно, что (1) для иммобилизованной о-ДФО льна оптимальное для проявления каталитических свойств значение ионной силы составляет 0,2 М; (2) графики изменений значений и  $K_M$ , и  $k_{cat}$  для иммобилизованной формы о-ДФО льна расположены выше графиков изменений значений  $K_M$  и  $k_{cat}$  для водорастворимой формы биокатализатора. Это свидетельствует о худшем взаимодействии фермента с субстратом для иммобилизованной формы в сравнении с водорастворимой формой. В то же время биокатализ ( $k_{cat}$ ) идёт значительно (~ в 3 раза) интенсивнее в случае иммобилизованной о-ДФО льна.

**Заключение.** Иммобилизация трёхкратно усиливает каталитическую активность о-ДФО льна в сравнении с растворимой формой.

### Список литературы

- Волова Т.Г. 1999. Биотехнология. Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения РАН. 252 с.
- Кёстнер А.И. 1974. Иммобилизованные ферменты // Успехи химии. Т. 43. Вып. 8. С. 1480-1499.
- Лапина Г.П., Лихуща П.С. 2010. Закономерности хода ферментативной реакции, катализируемой о-дифенолоксидазой льна при варьировании

ионной силы раствора // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. Вып. 20. № 32. С. 23-26.

*Лихуша П.С., Лапина Г.П.* 2009. Зависимость ферментативных параметров о-дифенолоксидазы льна-долгунца от ионной силы раствора // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. Вып. 15. № 34. С. 29-41.

*Тривен М.* 1983. Иммуобилизованные ферменты. М.: Мир. 213 с.

## IMMOBILIZATION OF O-DIPHENOLOXYDASE OF FLAX

**P.S. Likhusha, G.P. Lapina**

Tver State University, Tver

Immobilization of o-DPO on the solid medium under earlier developed optimal conditions (Likhusha, Lapina, 2009; Lapina, Likhusha, 2010) is studied. The enzymatic parameters of immobilized o-DPO of flax are described. The filtering paper and "Sorbfil" plates are used as mediums for the enzyme immobilization.

**Keywords:** *o-diphenoloxydase (o-DPO) of biofabrics of flax, benzidine, the Michaelis constant ( $K_M$ ), the catalytic constant ( $k_{kat}$ ), maximum speed ( $V_{max}$ ), immobilization*

### *Об авторах:*

ЛИХУША Павел Сергеевич – ассистент кафедры физико-химической экспертизы биоорганических соединений, ФГБОУ ВПО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 33, e-mail: slar1985@mail.ru.

ЛАПИНА Галина Петровна – доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой физико-химической экспертизы биоорганических соединений, ФГБОУ ВПО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 33, e-mail: Galina.Lapina@tversu.ru.

Лихуша П.С. Иммуобилизация о-дифенооксидазы льна / П.С. Лихуша, Г.П. Лапина // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2014. № 3. С. 27-30.