

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  $\beta$ -D-глюкозы в присутствии кислорода до  $\beta$ -D-глюконо- $\delta$ -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  $\beta$ -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***

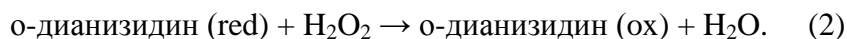
Изучение кинетики осуществлялось в термостатируемом реакторе периодического действия с возвратно-поступательным качанием. Оптическая плотность реакционной смеси измерялась на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ «Спектр»). Для центрифугирования использовалась центрифуга ОПн-8УХЛ4.2.

#### ***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  $\beta$ -D-глюкозу в присутствии кислорода до  $\beta$ -D-глюконо- $\delta$ -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).

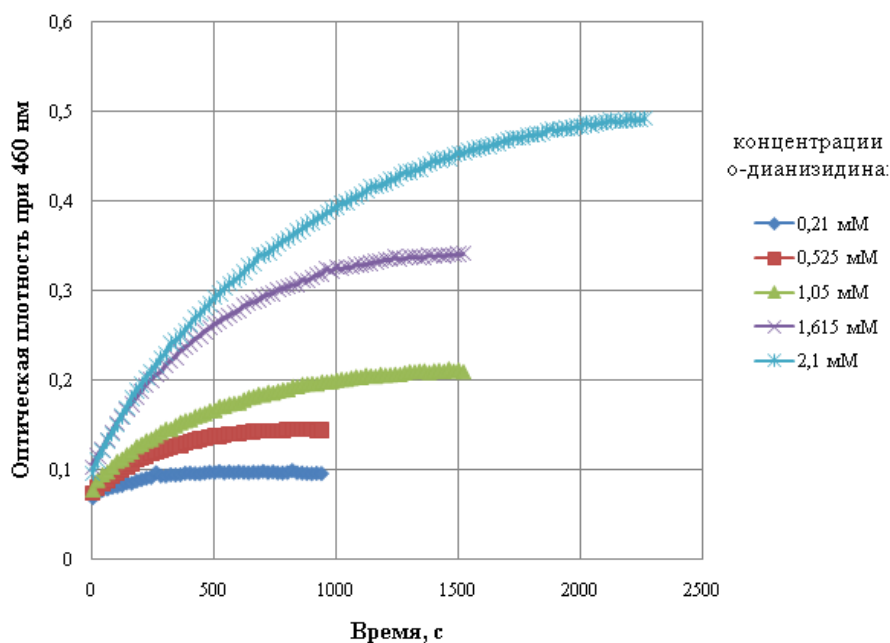
#### **Методика проведения кинетических экспериментов**

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 ( $t = 25^\circ\text{C}$ )

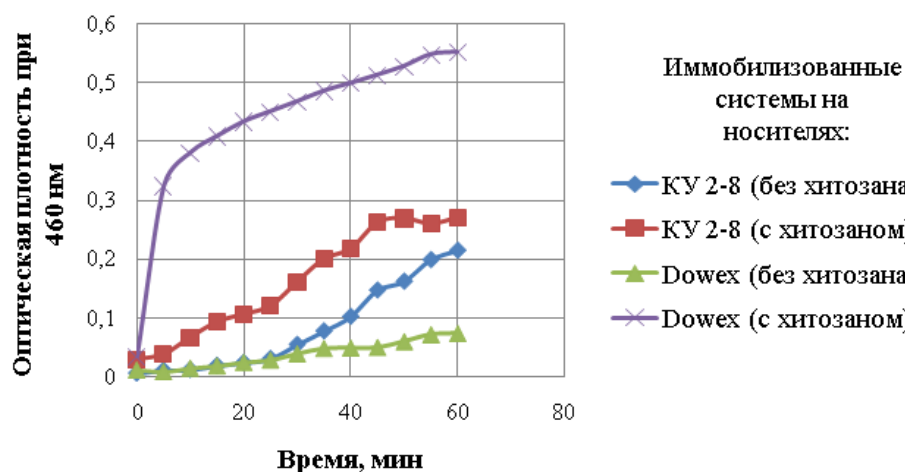
Кинетические параметры синтезированных катализаторов

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-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-о-дианизидин. Этот факт может быть объяснен многостадийностью процесса, а также недостаточно быстрым образованием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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  $\beta$ -D-glucose oxidation in the presence of oxygen to  $\beta$ -D-glucono- $\delta$ -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](mailto:tiboris@yandex.ru), [science@science.tver.ru](mailto:science@science.tver.ru)

СТАДОЛЬНИКОВА Полина Юрьевна – студентка магистратуры химико-технологический факультет, Тверской государственный технический университет, [science@science.tver.ru](mailto:science@science.tver.ru)

СИДОРОВ Александр Иванович – кандидат химических наук, профессор, кафедра биотехнологии и химии, Тверской государственный технический университет, [science@science.tver.ru](mailto:science@science.tver.ru)

ЛАКИНА Наталья Валерьевна - кандидат химических наук, доцент, кафедра биотехнологии и химии, Тверской государственный технический университет, [science@science.tver.ru](mailto:science@science.tver.ru)