

# Анализ активности иммобилизованных ферментативных препаратов редьки черной методом спектроскопии электрохимического импеданса

Е. Д. Першина, М. О. Ходыкина, К. А. Каздобин

*Институт общей и неорганической химии им. В.И. Вернадского НАН Украины,  
пр. Паладина, 32/34, г. Киев, 03142, Украина, e-mail: kazdobin@ionc.kiev.ua*

При исследовании взаимодействия ферментативного препарата редьки черной с различными неорганическими подложками (каолин, аэросил, бентонит и его модифицированная форма) методом спектроскопии электрохимического импеданса показано, что наличие сильных протонпроводящих свойств подложки ускоряет превращение протондонорного субстрата, а электрон-проводящие свойства влияют на превращение электрондонорного субстрата. Установлены основные причины, позволяющие целенаправленно управлять пероксидазной и оксидазной активностью иммобилизованного фермента.

*Ключевые слова: ферментативный препарат редьки черной, аэросил, бентонит, каолин, стабильность, спектроскопия импеданса.*

УДК 544.723.2: 544.636/.638

## ВВЕДЕНИЕ

Расширение областей использования иммобилизованных растительных редокс-ферментов в различных практических приложениях является предметом многочисленных исследований последнего времени [1, 2]. Особый интерес вызывают исследования механизмов электронного переноса между ферментом, подложкой и электродом, поскольку фермент определяет перспективность использования таких материалов в биоэлектрокатализе, и особенно – в биосенсорике [3]. Это связано с тем, что ферментные электрохимические системы способны облегчать электронный транспорт благодаря собственной селективности и редокс-активности, которые являются функцией электроно- и протоноакцепторной способности отдельных участков молекулы фермента [4]. Поэтому изменение знака носителя заряда является одним из основных показателей окислительной активности фермента. Полагают, что редокс-активность подобной системы, образовавшейся в результате иммобилизации фермента на носителе, зависит от реализации сопряженных взаимодействий и химического сродства фермента к подложке, приводящего к высокой прочности образующегося композита. Однако наличие сопряженных взаимодействий фермент/носитель может не только значительно снижать селективность и суммарную активность такой системы, но и изменять направленность его действия в зависимости от природы носителя и среды [5].

В то же время при исследовании электрохимических свойств биоэлектрокаталитических систем имеются некоторые неясности при трактовке отрицательных значений сопротивлений,

появляющихся в спектрах импеданса исследуемых объектов. Так, авторами [6] появление отрицательных значений сопротивлений в спектрах импеданса микробиологических топливных элементов трактуется как протекание редокс-реакции на полупроводниковых анодах при нулевом значении частоты токовой компоненты. Такой вывод делается исключительно из анализа спектров в координатах Найквиста, дающих только абсолютные значения частотного диапазона без учета сдвига фазового угла в данной области частот. Это создает определенные ограничения в анализе получаемых экспериментальных данных. Расширить область применения спектроскопии электрохимического импеданса на исследование сложных микрогетерогенных (суспензионных и биохимических) систем можно, если учесть появление магнитных эффектов при движении ионов в электрическом поле [7]. В этом случае полный импеданс такой системы выражается как

$$Z = \sqrt{R^2 + (X_L - X_C)^2}, \quad (1)$$

где  $R$  – активное (фарадеевское сопротивление);  $X_L$  – сопротивление индуктивности;  $X_C$  – сопротивление, вызванное формированием двойного электрического слоя (емкостное сопротивление) и протеканием электродной реакции. Таким образом, анализ базового уравнения электрохимического импеданса позволяет заключить, что наличие положительного значения мнимой части импеданса в координатах Найквиста связано с появлением индуктивных (магнитных) эффектов.

В таком контексте некоторые электрохимические свойства исходных компонентов и образующейся композитной системы, в частности при-

рода и знак носителя заряда, могут служить качественной и количественной оценкой направленной иммобилизации, позволяющей не только сохранять, но и регулировать суммарную редокс-активность электрохимической системы. Поэтому использование электрохимических методов исследования и их развитие для более глубокого понимания механизмов работы сложных ферментных систем приобрели новые акценты.

Цель настоящего исследования – определение знака носителя заряда и условий его изменения в системах ферментативных препаратов на основе оксидоредуктаз, иммобилизованных на подложках с различными кислотно-основными и редокс-свойствами методом спектроскопии электрохимического импеданса (СЭИ).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом изучения являлся нативный и иммобилизованный на водонерастворимых подложках ферментативный препарат корнеплода редьки черной. Процедура иммобилизации проводилась адсорбционным методом и состояла в смешивании ферментативного препарата и носителя в оптимальных условиях, отделении нерастворимого компонента смеси от растворимого центрифугированием [8].

Ферментативный препарат получали экстрагированием из измельченного сырья при pH 6,86 в фосфатном буфере. Выделение препарата проводилось в центрифуге СМ-50 на скорости 7000 об/мин. Прозрачную надосадочную жидкость использовали как источник фермента [9, 10].

В качестве субстратов-восстановителей для оценки пероксидазной активности применяли гидрохинон квалификации «хч», тиосульфат натрия (стандарт-титр), субстрат окислителя – пероксид водорода (фармацевтический раствор). Все аналитические растворы готовили на дистиллированной воде.

Средняя пероксидазная активность полученных ферментативных препаратов оценивалась кинетическим методом по начальной скорости реакции ферментативного окисления гидрохинона ( $\tau = 10$  мин).

Изменение концентрации гидрохинона в исследуемых системах контролировали фотоколориметрическим методом по реакции с о-фенантролином в присутствии ионов  $Fe^{3+}$  [11]. За единицу активности принимали количество окисленного субстрата (мкМ), катализированное 1 мл ферментативного препарата в течение 1 мин.

Активность рассчитывали по формуле:

$$A \text{ (активность)} = \frac{C(\text{гидрохинона}) \cdot V(\text{реакционной смеси, л})}{V(\text{фермента, мл}) \cdot t(\text{мин})}; \quad (2)$$

$$1 \cdot \frac{\text{мкмоль(субстрата)}}{\text{мл(фермента)} \cdot \text{мин}} = 1 \text{ е.а.}$$

В качестве подложки для иммобилизации фермента использованы неорганические материалы различного происхождения, природы и строения (табл. 1).

ИК-спектры ферментативного препарата, подложек и композитных материалов сняты на спектрофотометре Specord M80 Karl Zeiss Jena, BRD.

Определение pH и окислительного  $Eh$ -потенциала проводили на иономере И-160М с использованием хлорсеребряного (ЭВЛ-1МЗ.1), стеклянного (ЭС-1) и платинового электродов. Ошибка измерений составила  $\pm 2$  мВ.

Исследования механизмов проводимости нативного ферментативного препарата и образцов, иммобилизованных на носителях, осуществляли на основе анализа спектров электрохимического импеданса 0,5% водных суспензий нативного и иммобилизованного препаратов при  $22 \pm 2^\circ C$ .

Спектры импеданса снимали в двухэлектродной ячейке с платиновыми электродами площадью по  $1 \text{ см}^2$  на расстоянии 1 см на электрохимическом модуле Autolab-30 модели PGSTAT302N Metrohm Autolab, оснащенный модулем FRA (Frequency Response Analyzer), в интервале  $10^{-2}$ – $10^6$  Гц. Управление модулем осуществляли при помощи программы Autolab 4.9 по стандартной процедуре с последующей обработкой в пакете Zview 2.0. Моделирование электрохимических реакций проводили по методу эквивалентных схем.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования кинетики изменения pH и областей появления точек изоэлектрического сдвига в нативном ферментном препарате показали наличие эффектов, которые приводят к подавлению электрондонорных свойств фермента и появлению избытка протонов в первые 2 час контакта фермента с водной средой (рис. 1). Подобное поведение соответствует строению ферментов оксидоредуктазного типа, имеющих  $VH^+$  и  $OH$  группы [4], которые управляют суммарной редокс-активностью. Поэтому электрохимические свойства протона могут служить тестом для оценки общей редокс-активности любых ферментных систем.

Учитывая полученные результаты, проведен математический анализ импеданса ферментных систем на основании предположения об участии свободных протонов в формировании основных носителей заряда [12].

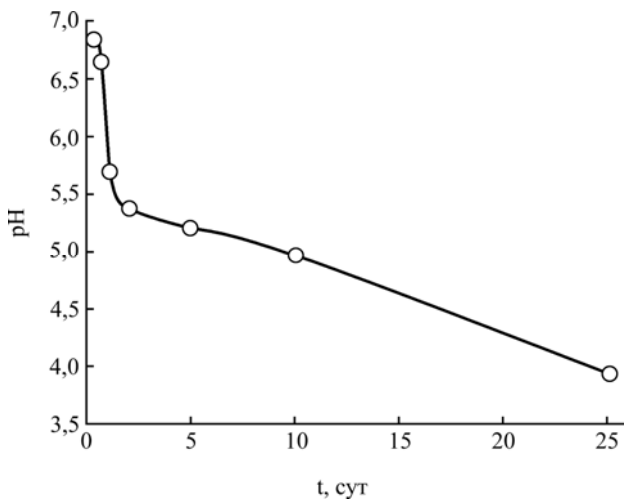
Следуя этому предположению, выразим удельную электропроводность дистиллированной воды:

**Таблица 1.** Происхождение, химический и структурный состав использованных подложек

Материал	Состав, %	Метод обработки	Структура
Бентонит (месторождение Дашуковка, Украина)	SiO <sub>2</sub> – 68,64; Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> – 11,50; TiO <sub>2</sub> – 0,32; Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> – 1,56; CaO – 1,46; MgO – 0,50; Na <sub>2</sub> O – 2,34; K <sub>2</sub> O – 2,40.	Отмучивание мелкой фракции в воде	Слоистая. Размер зерна 50–110 нм
Бентонит, модифицированный фосфат-ионами	SiO <sub>2</sub> – 68,64; Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> – 11,50; TiO <sub>2</sub> – 0,32; Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> – 1,56; CaO – 1,46; MgO – 0,50; Na <sub>2</sub> O – 2,34; K <sub>2</sub> O – 2,40. P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> – до 5	Низкотемпературная обработка H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Слоистая. Размер зерна 50–70 нм
Каолин (Глуховецкое месторождение, Украина)	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> – 35,5; SiO <sub>2</sub> – 62; TiO <sub>2</sub> – 0,4; Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> – 0,35; MgO 0,18–0,9; CaO – 0,71; Na <sub>2</sub> O+K <sub>2</sub> O 0,18–1,6.	Отмучивание мелкой фракции в воде	Слоистая. Размер зерна 50–70 нм
Аэросил – 300	SiO <sub>2</sub> – 100		аморфная

$$\sigma = e [H^+] t_+, \quad (2a)$$

где  $e$  – элементарный заряд;  $[H^+]$  – концентрация протонов в единице объема;  $t_+$  – подвижность протонов.



**Рис. 1.** Кинетика изменения pH в фосфатно-буферном экстракте ферментативного препарата.

Принимая во внимание наличие собственного магнитного момента у свободного протона, получаем выражение для константы Холла:

$$R_H = 1 / [H^+] e. \quad (3)$$

Таким образом, с повышением концентрации протонов следует ожидать уменьшение значения постоянной Холла, поэтому отношение попереч-

ной разности потенциалов к продольному току будет уменьшаться:

$$R_H = \frac{U_{\text{поперечное}}}{I_{\text{продольное}}}. \quad (4)$$

Это соответствует практическому отсутствию сопротивления вдоль продольной линии тока. Наличие таких эффектов должно соответствовать появлению на спектрах импеданса областей с нулевыми значениями реактивного сопротивления (рис. 2).

При наличии индуктивной составляющей общее сопротивление системы представляется как

$$Z = R + j \left( \omega L - \frac{1}{\omega C} \right) = R + jX, \quad (5)$$

то есть закон Ома запишем в форме:

$$I = E / R + jX. \quad (6)$$

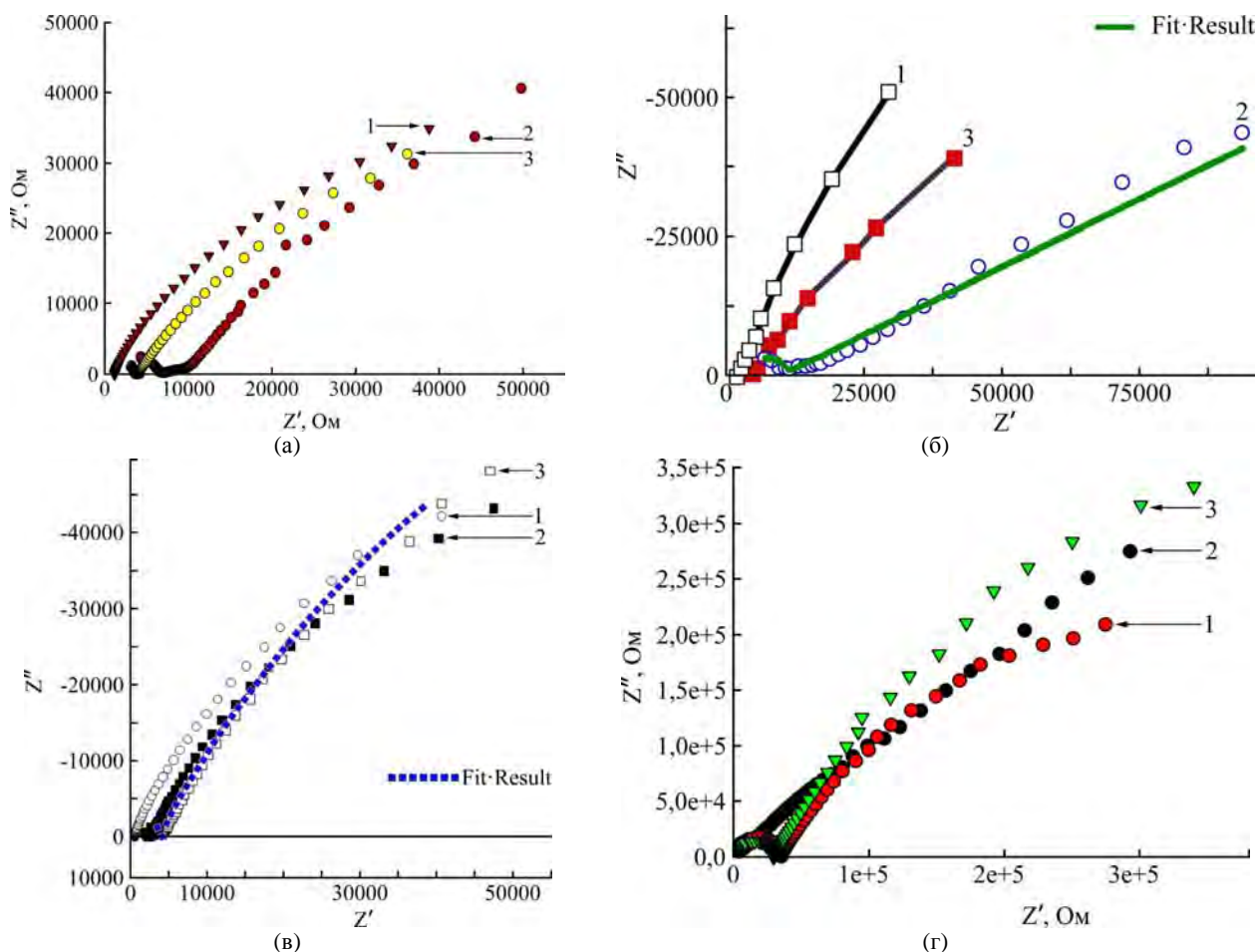
При  $R > jX$   $\Sigma R + jX$  всегда будет  $> 0$ , поэтому, используя выражение для плотности тока

$$i = \frac{I}{S} = \frac{q}{tS} = epp_{\pm}, \quad (7)$$

получаем зависимость для плотности заряда, которая входит в уравнение постоянной Холла, определяющей знак носителя заряда:

$$R_H = \frac{1}{pe}, \quad (8)$$

$$R_H = \frac{\sigma_p^2 R_p + \sigma_e^2 R_e}{(\sigma_p + \sigma_e)^2}. \quad (9)$$



**Рис. 2.** Спектры импеданса 0,5% суспензий пероксидазы, иммобилизованной на бентоните (а), каолине (б), модифицированном бентоните (в) и аэросиле – 300 (г): 1 – исходный материал подложки; 2 – то же с адсорбированной пероксидазой на подложке; 3 – через 3 дня выдержки иммобилизованных образцов в дистиллированной воде.

Следовательно, знак алгебраической суммы активного и реактивного сопротивлений в спектрах импеданса

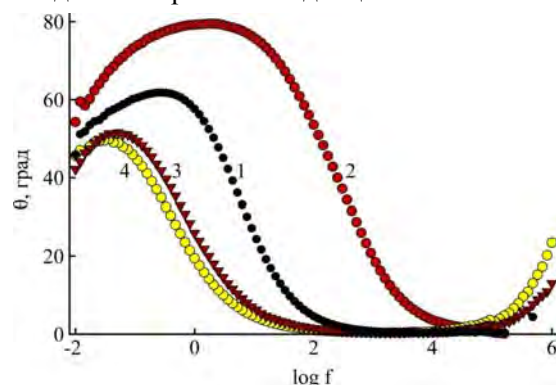
$$\sum = R + X \quad (10)$$

позволяет оценить знак основного носителя тока.

Анализ спектров импеданса в координатах Боде обнаружил наличие резонансных частотных областей сдвигов фазового угла  $\Theta$  во всех исследованных системах, которые в соответствии с уравнением (5) выбраны в качестве основных зон для получения значений активного и реактивного сопротивлений и дальнейшего расчета суммарного сопротивления и типа носителя заряда (рис. 3, табл. 2).

Использование предлагаемой методики оценки типа носителя заряда и значение его суммарного импеданса, полученное по формуле (10), обнаружило зависимость знака и значения алгебраической суммы реактивного и активного сопротивлений от типа подложки, что указывает на способность подложки влиять не только на редокс-свойства фермента путем изменения знака носителя заряда (протонная и электронная составляющие), но и на суммарное количество но-

сителей заряда в исследуемых системах (табл. 2). Во всех экспериментах, за исключением систем с каолином, наблюдается повышение протонной активности композита, которая достигает максимума на подложке из аэросила – 300. Это свидетельствует о резком повышении окислительной активности системы. В системах с каолином наблюдается обратная тенденция.



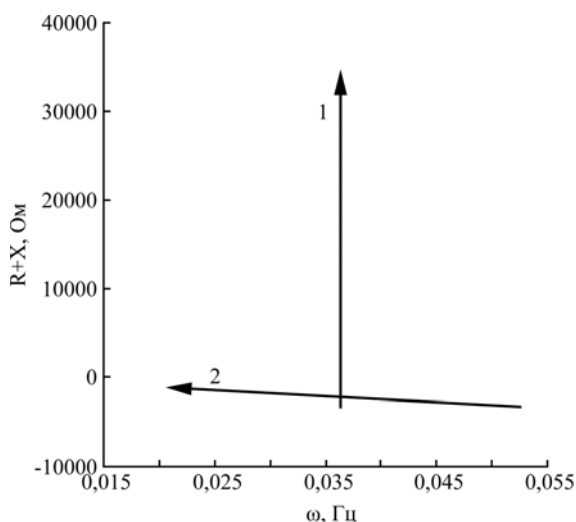
**Рис. 3.** Спектры импеданса нативного ферментативного препарата в координатах Боде (1), подложки – модифицированного бентонита (2) и композитов с иммобилизованным ферментом в начальный момент времени (3) и после 3 суток выдержки в дистиллированной воде (4).

Сопоставление векторов направленности электронной и протонной областей проводимо-

**Таблица 2.** Основные характеристики резонансных областей спектров импеданса водных суспензий, содержащих фермент

Система	$R_s$	Сдвиг фазового угла, $\theta$	Резонанс, частота, Гц	Начальное значение, $Z''$ , Ом	Начальное значение, $Z'$ , Ом	$\Sigma = R+X$
Бентонит мод.+ $H_2O$	$560,5 \pm 20$	-61,773	0,27543	$-5280,8 \pm 50$	$2834,8 \pm 20$	$-2446 \pm 70$
То же + фермент	$3733 \pm 20$	-49,86	0,036308	$-20665 \pm 50$	$17426 \pm 20$	$-3239 \pm 70$
То же + фермент 3 дня	$2492 \pm 20$	-51,591	0,052481	$-15232 \pm 50$	$12077 \pm 20$	$-3175 \pm 70$
Бентонит	$559 \pm 20$	-14,602	1,1227	$-1477,3 \pm 50$	$5671 \pm 20$	$+4193,7 \pm 70$
Бентонит + фермент	$7435 \pm 20$	-40,07	0,036308	$-18234 \pm 50$	$21677 \pm 20$	$+3443 \pm 70$
То же, 3 дня	$3893 \pm 20$	-44,545	0,020893	$-20567 \pm 50$	$20896 \pm 20$	$+329 \pm 70$
Каолин	$2861 \pm 20$	-61,78	0,043651	$-23272 \pm 50$	$12489 \pm 20$	$-10783 \pm 70$
Каолин + фермент	$9976 \pm 20$	-30,984	0,020893	$-51518 \pm 50$	$85795 \pm 20$	$+34277 \pm 70$
То же, 3 дня	$5100 \pm 20$	-46,524	0,036308	$-22562 \pm 50$	$21393 \pm 20$	$-1169 \pm 70$
Аэросил – 300	–	-42,004	0,075858	$-79541 \pm 50$	$88326 \pm 20$	$+8785 \pm 70$
Аэросил – 300 + фермент	–	-45,528	0,043651	$-118730 \pm 50$	$116560 \pm 20$	$-2170 \pm 70$
То же, 3 дня	–	-51,097	0,043651	$-143580 \pm 50$	$115870 \pm 20$	$-27710 \pm 70$

сти показало наличие продольной и поперечной компонент в движении зарядов разного знака (рис. 4). При этом отрицательная компонента (электронная проводимость) в зависимости от материала подложки охватывает более широкий частотный диапазон, чем положительная (протонная проводимость).



**Рис. 4.** Векторная зависимость отрицательной (1) и положительной (2) токовых компонент от частоты.

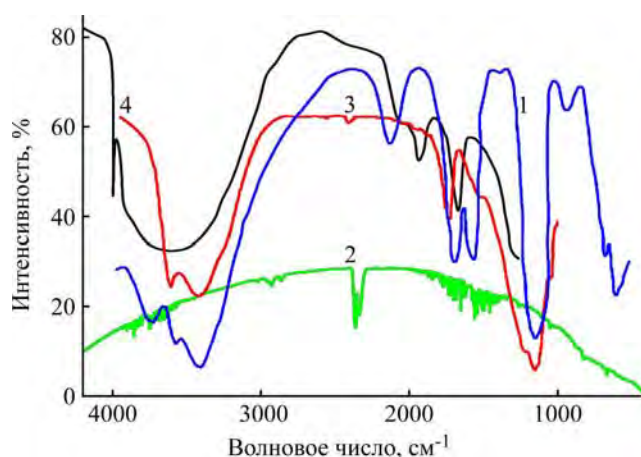
Отсюда можно заключить, что наличие высоких положительных значений  $\Sigma = R + X$  (электронной проводимости) будет приводить к инициации электронной проводимости иммобилизованного фермента. Таким образом, максимально эффективной подложкой для иммобилизации ферментативного препарата редьки черной, повышающей в присутствии воды долю электрон-

ной проводимости, является аэросил – 300. Обратное влияние будет оказывать подложка, обладающая высоким отрицательным значением  $\Sigma = R + X$ , то есть высокой протонной проводимостью.

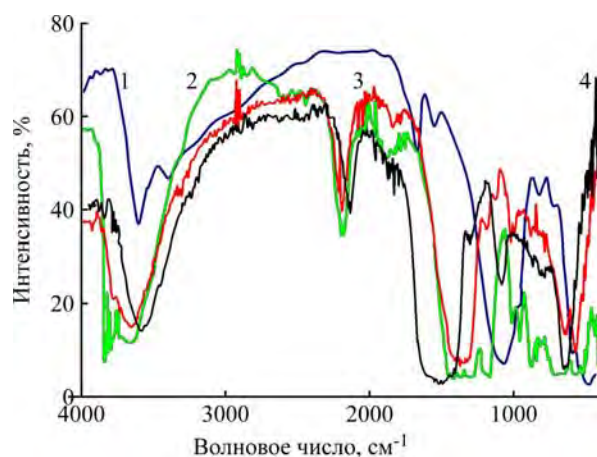
Полученные результаты позволяют учесть сопряженные взаимодействия фермента и подложки, а также оценить стабильность электрохимического поведения во времени всей системы в целом. Для проверки полученных выводов и определения влияния структурных особенностей минеральной подложки на стабильность редокс-активности иммобилизованного фермента параллельно были сняты ИК-спектры всех исследованных подложек (рис. 5) и композитов (рис. 6).

В спектре исследуемого бентонита (рис. 5, табл. 3) идентифицированы все наиболее характерные для минералов Дашуковского месторождения полосы поглощения, а именно: полосы поглощения с максимумами 470, 1040 обусловлены колебаниями Si-O связей; 525 – Si-O-Al, колебания OH-групп проявляются в виде полос поглощения в областях 1600–3200 и 3200–4000  $cm^{-1}$  [13–15].

Максимальную стабильность во времени показала подложка из модифицированного фосфат-ионами бентонита (табл. 4). В спектре исследуемого модифицированного бентонита идентифицированы все наиболее характерные для данного минерала полосы поглощения. Полосы поглощения с максимумами 470, 1037 обусловлены колебаниями Si-O связей; 525 – Si-O-Al, колебания OH-групп проявляются в виде полос поглощения в областях 1600–3200 и 3200–4000  $cm^{-1}$  (табл. 4,



**Рис. 5.** ИК-спектры неорганических подложек: 1 – бентонит; 2 – каолин; 3 – модифицированный фосфат-ионами бентонит; 4 – аэросил – 300.



**Рис. 6.** ИК-спектры пероксидазы, иммобилизованной на неорганических подложках: 1 – бентонит; 2 – каолин; 3 – модифицированный фосфат-ионами бентонит; 4 – аэросил.

**Таблица 3.** Положение полос поглощения в ИК-спектре бентонита

Частота колебаний, см <sup>-1</sup>			Тип колебаний	Атомная группа [13–15]
	Бентонит	Бентонит + пероксидаза		
3700	3710, 3640	3600	$\nu$	-ОН (структурн.)
3400	3400	3400	$\nu$	H <sub>2</sub> O (адсорбц.)
2320	2320	–	$\nu$	H <sub>2</sub> O
	1640	–	$\delta$	H <sub>2</sub> O
1627–1683	–	1630	$\delta$	C=O (амид I)
1498–1587	–	1500	$\nu$	N-H в плоскости (амид II)
	1450	–	$\delta$	-ОН
1040	1040	1030	$\delta$	Si-O-Si
613–700	–	680	$\nu$	O=C-N в плоскости (амид IV)
525	525	520	$\delta$	смешанные Si-O-Al и Mg-O
	470	470	$\delta$	Si-O
470	430	430	$\delta$	Fe(III)-O в окт. позициях

**Таблица 4.** Характеристические длины волн модифицированного фосфат-ионами бентонита и ферментного композита на его основе

Частота колебаний, см <sup>-1</sup>			Тип колебаний	Атомная группа [13–15]
	Мод. бентонит	Мод. бентонит + пероксидаза		
3700	3625, 3575	3840, 3792	$\nu$	-ОН (структурн.)
3400	3437	3428	$\nu$	H <sub>2</sub> O (адсорбц.)
2320	–	2368, 2364, 2336, 2304	$\nu$	H <sub>2</sub> O
	1650	–	$\delta$	H <sub>2</sub> O (адс)
	1575	–	$\delta$	-ОН
1627–1683	–	1654, 1648, 1642	$\nu$	C=O (амид I)
1498–1587	–	1562, 1556, 1500	$\delta$	N-H в плоскости (амид II)
	1375	–	$\delta$	-ОН
1040	1037	1064	$\nu$	Si-O-Si
613–700	–	694, 668	$\delta$	O=C-N в плоскости (амид IV)
525	525	520	$\delta$	смешанные Si-O-Al и Mg-O
470	–	470	$\delta$	Fe(III) в окт.позициях

рис. 5, 6) [13–15]. Однако, относительно исходного природного минерала наблюдается смещение пика адсорбированной воды в более длинноволновую область, а проявление структурных

ОН-групп – в более коротковолновую область, что в сумме снижает волновой диапазон в 1,5 раза. Следовательно, возможно снижение энергетического барьера при образовании водородных



связей между ОН-группами и водой или ОН-группами и полярными группами фермента, что должно приводить к более стабильной редокс-активности композита.

Присутствие в ИК-спектре модифицированного бентонита, контактировавшего с раствором ферментативного препарата, полос, характерных для колебаний амидных групп белков (1654, 1648, 1642 –  $\nu$ ) C=O (амид I), 1562, 1556, 1500 – ( $\delta$ )N-H в плоскости (амид II), 694, 668 – ( $\delta$ ) O=C-N в плоскости (амид IV)), подтверждает сорбционное связывание фермента на подложке. Сдвиг и уменьшение интенсивности полос поглощения амид-I с 1650 до 1640 и амид-II с 1520 в 1500 обычно обусловлены изменениями CN-конформации белковой молекулы [4]. В связи с отсутствием полос поглощения, характерных для валентных колебаний групп C-N (амид – A, B) – 3300–3100  $\text{см}^{-1}$ , и значительными изменениями спектра в области валентных колебаний свободных гидроксид-групп поверхности модифицированного бентонита и адсорбированной воды: смещение полосы 3437 до 3428  $\text{см}^{-1}$ , а также деформационных колебаний адсорбционной воды (1650  $\text{см}^{-1}$ ) и 1375 ( $\delta$  – тетраэдр Si-OH) свидетельствует об образовании прочных химических связей молекул фермента с бентонитом и подтверждает наличие необратимого связывания, что и определяет стабильность редокс-активности полученного композита.

Наибольшую нестабильность, по данным СЕИ, показал каолин. На ИК-спектрах каолина наблюдаются полосы в диапазонах, характерных для валентных колебаний гидроксид-аниона (3620–3700  $\text{см}^{-1}$ ). При детальной расшифровке спектра обнаружен небольшой пик с максимумом 1682  $\text{см}^{-1}$ , который характерен для колебаний поверхностной воды в комплексе типа M-OH<sub>2</sub> и указывает на слабую фиксацию воды поверхностью минерала, а также на конкурирующую адсорбцию фермента этими группами при иммобилизации фермента на каолине. Обнаруженные характерные для колебаний амидных групп белков полосы: ( $\nu$ ) связи C=O (амид I), ( $\delta$ ) N-H в плоскости (амид II), ( $\delta$ ) O=C-N в плоскости (амид IV) подтверждают слабое сорбционное связывание фермента на каолине. Таким образом, наличие конкурентной обратимой адсорбции и приводит к нестабильности редокс-активности композита (табл. 5, рис. 5, 6).

Максимально высокая электронная проводимость зафиксирована на подложке из аэросила – 300, в ИК-спектре исходного аэросила идентифицированы полосы, отвечающие следующим видам колебаний поверхностных гидроксидов: 3752, 3744  $\text{см}^{-1}$  –  $\nu$ -колебания ОН-основная (Н-связанная). После адсорбции фермента про-

являются характерные для белков полосы амид I и амид II (1500–1700  $\text{см}^{-1}$ ). Присутствие в спектре характерных полос амид I и амид II позволяет заключить, что при адсорбции не происходит существенных изменений вторичной структуры белковой молекулы. Однако при иммобилизации фермента на аэросиле в ИК-спектре появляются изменения в области валентных колебаний связанных водородной связью основных гидроксидов поверхности аэросила (водородных связей (3400–3750  $\text{см}^{-1}$ ) и адсорбционной воды (1670–1640  $\text{см}^{-1}$ )). Так, значительно уменьшается интенсивность полосы 3750  $\text{см}^{-1}$  и вовсе исчезает полоса 1670–1640  $\text{см}^{-1}$  ( $\delta$  H<sub>2</sub>O (адс)), что, очевидно, связано с образованием водородных связей белковой части фермента с поверхностью подложки, частично удерживающих фермент от десорбции (табл. 6, рис. 5, 6).

Анализ спектров импеданса и ИК-спектров позволил предположить консервирующее действие подложки на иммобилизованный ферментативный препарат с последующей его активацией в водной среде. Это нашло подтверждение в экспериментах по исследованию окислительной активности систем (табл. 7).

Иммобилизация ферментативного препарата, выделенного из корнеплода редьки черной на аэросиле, при контакте с водой увеличивает ее активность относительно субстрата-восстановителя гидрохинона в 1,8 раза. При длительном контакте с водой (более 1 сут.) степень превращения гидрохинона возрастает с 20 (система II) до 29% (система I). Исходя из принципа независимости протекания отдельных стадий в сложных процессах и сопоставления данных по адсорбции гидрохинона на подложке, было установлено, что 27% приходится на превращение гидрохинона за счет процесса окисления, а 2% – на адсорбцию гидрохинона на аэросиле (система III). Низкий вклад адсорбции в конверсию гидрохинона подтверждает активирующее действие подложки аэросила на ферментативный препарат.

При исследовании динамики инактивации фермента при контакте с воздухом установлено, что нативный фермент теряет свою активность (уменьшается на 50%) в реакции окисления гидрохинона в течение первых двух часов (рис. 7). При этом уменьшение активности симбатно кинетике повышения pH системы, что является дополнительным доказательством роли протона в устойчивости и активности ферментативных препаратов.

Таким образом, ранее выдвинутое предположение о консервирующей и активирующей роли подложки на основе аэросила в присутствии воды получило экспериментальное подтверждение: в результате иммобилизации ферментативного

**Таблица 5.** Характеристические длины волн каолина и ферментного композита на его основе

Частота колебаний, см <sup>-1</sup>			Тип колебаний	Атомная группа [13–15]
	Каолин	Каолин + фермент		
3700	3780	3696, 3676, 3668, 3652	$\nu$	-ОН серпентита (структурн.)
3620	3640	3624	$\nu$	-ОН
3400	3465	3440	$\nu$	H <sub>2</sub> O (адс)
2320	2420	2368, 2324, 2320	$\nu$	H <sub>2</sub> O
1640	1682	–	$\delta$	H <sub>2</sub> O (адс)
1627–1683	–	1644	$\nu$	C=O (амид I)
1498–1587	–	1536, 1500, 1492	$\delta$	N-H в плоскости (амид II)
	1472	–	$\delta$	-ОН
1100	1125	1104	$\nu_{as}$	Si-O-Si
850–1100	937, 1060	916, 964	$\nu$	молекул тетраэдров, составленных из атомов O <sub>2</sub> с атомами Si внутри
730–760	748, 717	754, 730	$\nu$	группы SiO <sub>2</sub>
613–700	–	696	$\delta$	O=C-N в плоскости (амид IV)
≤ 500	544, 465, 433	568	$\delta$	группы SiO <sub>2</sub> Si-O-Al <sup>VI</sup> – связи
	–	384	$\delta$	Fe(III) в окт позициях

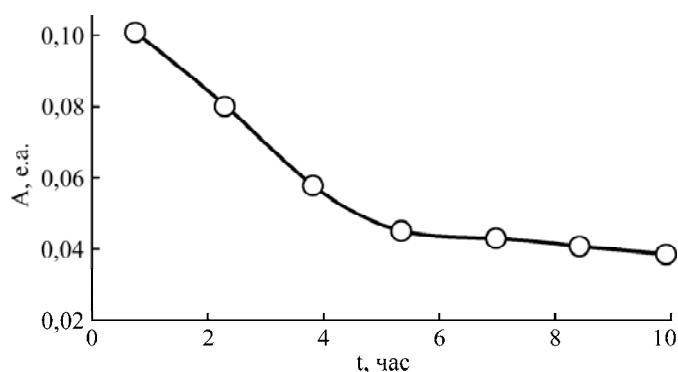
**Таблица 6.** Характеристические длины волн аэросила и ферментного композита на его основе

Частота колебаний, см <sup>-1</sup>			Тип колебаний	Атомная группа [13–15]
	Аэросил	Аэросил + фермент		
3750	3750	3752, 3744	$\nu$	-ОН-основная (H-связанная)
3400	3250–3500	3464	$\nu$	H <sub>2</sub> O (адс)
	1900–1875	–	$\delta$	-ОН
1627–1683	–	1636	$\nu$	C=O (амид I)
	1670–1640	–	$\delta$	H <sub>2</sub> O (адс)
1498–1587	–	1524	$\delta$	N-H в плоскости (амид II)
1100	1260	1116	$\nu_{as}$	Si-O-Si
	–	480	$\delta$	Fe(III) в окт позициях

**Таблица 7.** Активность ферментативного препарата в нативной и иммобилизованной на аэросиле системах

Состав системы	Система (общий объём V = 50 мл)			
	I	II	III	IV (контрольная)
Субстрат-восстановитель	C <sub>нач</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> ) = 0,0005 моль/л			
Субстрат-окислитель	C (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) = 0,05 моль/л;			–
Ферментативный препарат	(аэросил + фермент) m = 1 г	V(ф. преп.) = 5 мл	силикагель m = 1 г	–
$\overline{C}_{конечн}$ (C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> ), М	0,00036;	0,00040;	0,00049	0,00050
Средняя степень превращения C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub> ; (τ = 10 мин) N̄, %	29	20		0
Средняя молярная активность, $\overline{A}$ , е.а.	0,18 ± 0,001	0,1 ± 0,002	–	–





**Рис. 7.** Динамика изменения молярной активности относительно гидрохинона нативного ферментативного препарата при стоянии на воздухе.

**Таблица 8.** Пероксидазная активность ферментативного препарата редьки черной, иммобилизованного на аэросиле (система I, время хранения 30 сут)

$C_{нач}$ ( $C_6H_4(OH)_2$ )	Начальная оптическая плотность раствора $D_0$	Конечная оптическая плотность раствора $D_x$	$C_{конечн}$ ( $C_6H_4(OH)_2$ )	$\bar{N}$ , %	$\bar{A}$ , е.а.
0,00050 моль/л	0,185	0,148	0,00039 моль/л	22	$1,4 \pm 0,001$

препарата значительно увеличился срок его хранения. Так, в течение 30 суток средняя молярная активность в системе с гидрохиноном (I) уменьшилась с 29 до 22% (на 7%) (табл. 8).

### ВЫВОДЫ

Редокс- активностью иммобилизованного нативного фермента можно управлять, применяя подложки с преимущественно электронной или протонной проводимостью, которые влияют на окислительные или восстановительные свойства вновь образованной системы. Применяя расчетный метод на основе использования значений активного и реактивного сопротивлений, в области частот сдвига фазового угла на спектрах импеданса исследуемых систем возможна оценка влияния материала подложки на редокс- активность конечного композита и его стабильность во времени. Наличие высоких положительных значений  $\Sigma = R + X$  (электронной проводимости) будет приводить к инициации электронной проводимости иммобилизованного фермента. Обратное влияние будет оказывать подложка, обладающая высоким отрицательным значением  $\Sigma = R + X$ , то есть высокой протонной проводимостью. Стабильность композита во времени зависит от вида адсорбции фермента и наличия конкурирующей адсорбции воды.

### ЛИТЕРАТУРА

- Fornera S., Balmer T.E., Baozhong Zhang, Schluter A.D., Walde P. Immobilization of Peroxidase on SiO<sub>2</sub> Surfaces with the Help of a Dendronized Polymer and the Avidin-Biotin System. *Macromol Biosci.* 2011, **11**, 1052–1067.
- Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisán J.M., Fernandez-Lafuente R. Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity via Immobilization Techniques. *Enzyme Microb Tech.* 2007, **40**, 1451–1463.
- Hui Yao, Nan Li, Yan-Li Wei, Jun-Jie Zhu. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Biosensor Based on Immobilization of Horseradish Peroxidase in a Gelatin Network Matrix. *Sensors.* 2005, **5**, 277–283.
- Андреева В.А. *Фермент пероксидаза*. М.: Наука, 1988. 128 с.
- Nekrasova V.K. Some Electrochemical Properties of Enzyme Macromolecules in Water Solution. *Bioelectroch Bioener.* 1975, **2**(1), 43–51.
- Benetton Xochitl D., Navarro-Bvila S.G., Carrera-Figueiras C. Electrochemical Evaluation of Ti/TiO<sub>2</sub>-polyaniline Anodes for Microbial Fuel Cells using Hypersaline Microbial Consortia for Synthetic-wastewater Treatment. *J New Mat Elect Syst.* 2010, **13**, 1–6.
- Impedance Spectroscopy. Theory, Experiment and Applications*. Ed. E. Barsoukov, J. Ross Macdonald. 2nd ed., N.Y.: Wiley Interscience, 2005. 450 p.
- Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы*. Под ред. Дж. Вудворда. М.: Мир, 1988. 215 с.
- Селибер Г.Л. *Большой практикум по микробиологии*. М.: Мир, 1962. 492 с.
- Methods of Biochemical Analysis*. Ed. D. Glick, Inc., N-Y, London: Interscience Publishers, 1954. Vol. 1, P. 357–425.
- Лурье Ю.Ю., Рыбникова А.И. *Химический анализ производственных сточных вод*. М.: Химия, 1974. 395 с.
- Timp G., deVegvar P., Behringer R., Cunningham J.E., Howard R., Baranger H.U. and Jain J.K. Suppression of the Aharonov Bohm Effect in the

Quantized Hall Regime. *Phys Rev B*. 1989, **39**, 6227–6230.

13. Болдырев А.И. *Инфракрасные спектры минералов*. М: Недра, 1976. 199 с.
14. Тарасевич Ю.И. Определение ИК-спектров глинистых минералов и адсорбированных на них веществ. *Украинский химический журнал*. 1968, **34**(5), 439–446.
15. Накамото К. *ИК-спектры и спектры КР неорганических и координационных соединений*. М.: Мир, 1991. 536 с.

*Поступила 05.09.14*

### Summary

While studying the interaction of the enzyme preparation on the basis of black radish with various inorganic substrates (kaolin, aerosil, bentonite and its modified form) by the electrochemical impedance spectroscopy it was shown that the presence of strong proton-conducting properties of the substrate accelerates the conversion of proton-donor substrate and electron-conducting properties affect the transformation of the electron-donor substrate. It is thus possible to govern the peroxidase and oxidase activities of the immobilized enzyme.

*Keywords: enzyme preparation of black radish, aerosil, bentonite, kaolin, stability, impedance spectroscopy.*