

## АДСОРБЦИЯ НА ПЕРОКСИДАЗА ВЪРХУ АКТИВЕН ВЪГЛЕН

*Нина Димчева<sup>1\*</sup>, Костадинка Тодорова<sup>2</sup>, Елена Хорозова<sup>1</sup>*  
*<sup>1</sup> кат. Физикохимия, ПУ „Паисий Хилендарски” – Пловдив;*  
*E-mail: ninadd@argon.acad.bg*  
*<sup>2</sup> филиал “Любен Каравелов” – Кърджали*

### ABSTRACT

Peroxidase enzyme adsorption on activated carbon NORIT was studied. It was found that over the concentration range  $10^{-5} - 10^{-4}$  M the process obeys Langmuir adsorption isotherm, while at micromolar concentrations the Tyomkin isotherm is more relevant under the same conditions. Saturation of the adsorbent with biopolymer's molecules was reached at enzyme concentrations exceeding 0.1 mM. Quantitative parameters such as equilibrium constant K and the maximum adsorbed enzyme  $A_{\max}$  were determined from the linearized Langmuir isotherm.

*Ключови думи:* адсорбция, ензими, пероксидаза.

### ВЪВЕДЕНИЕ

Пероксидазата е биокатализаторът, вероятно с най-широкия спектър от практически приложения: от ELSA – тестовете, използвани в имуноанализа до разработването на биореактори и биосензорни системи за екологичен и клиничен мониторинг. Изследването на електрокаталитичната ѝ активност е от особено значение за развитието на биоелектрониката и сензорните технологии, тъй като ензимът притежава способността да комуникира с електродната повърхност директно [1, 2] или посредством нискомолекулни преносители на електрони (т. нар. медиатори) [3-5]. В този контекст, методите за закрепването му към електродната повърхност (т. нар. имобилизация) са ключов фактор, определящ до голяма степен както чисто каталитичната, така и електрохимична активност на пероксидазата.

Поради изключителната си простота на изпълнение, адсорбционната имобилизация е най-често използвана. Допълнителното ѝ предимство пред други методи се състои в това, че като правило ензимите се закрепват в конформация, близка до нативната (в разтвор) и следователно проявяват висока каталитична активност дори в имобилизирано състояние.

В достъпната литература, имобилизирането на пероксидазата чрез адсорбция обикновено се представя като рецептура в експерименталната секция, без при това да бъде дискутирано намирането на условията, при които се извършва тя - рН, концентрация на изходния ензимен разтвор, температура и др. Настоящото изследване е продължение на усилията на работната ни група да установи особеностите при адсорбцията на ензимите върху дисперсни неорганични носители [6, 7]. В тази връзка, целта на настоящата работа е да бъде изследвана адсорбцията на пероксидаза върху носител активен въглен и бъдат установени основните закономерности на процеса при избраните експериментални условия (стайна температура и физиологично рН на средата).

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

### *Реагенти*

При настоящите изследвания беше използвана пероксидаза от хрян (HRP) (EC 1.11.1.7.;  $M_r \sim 44\ 000$ ; с активност  $300-350\ U \cdot mg^{-1}$ ; "Reanal" - Унгария). За приготвяне на ензимни разтвори беше използван 0,1 М фосфатен буфер с рН 7,0. За имобилизация на ензима беше използван носител активен въглен NORIT. Носителят е със специфична повърхност  $\approx 1000\ m^2 \cdot g^{-1}$  и е фино дисперсен.

Всички реактиви, използвани за приготвяне на буферните разтвори бяха със спецификация "спектрално чисти" и не бяха подлагани на допълнителна обработка преди употреба. Бидестилирана вода беше използвана във всички случаи при получаването на буферни разтвори.

### *Материали и методи*

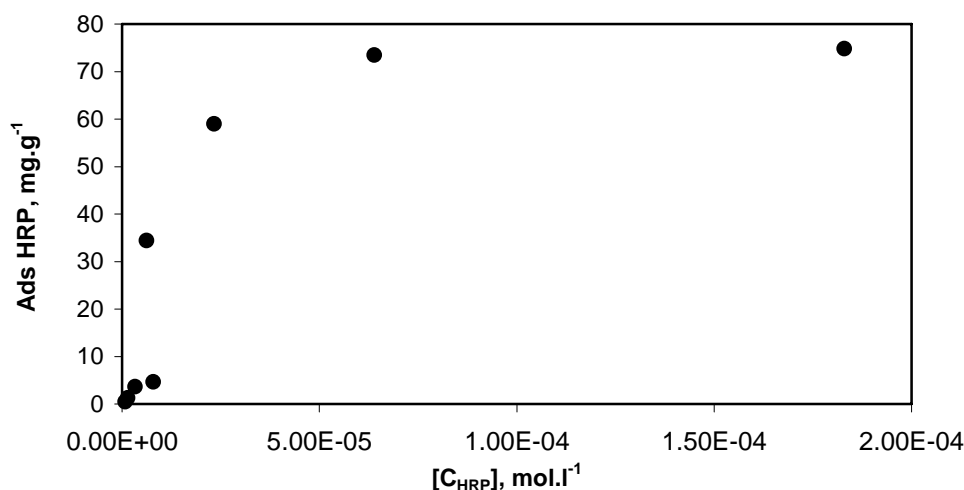
За изследване адсорбцията на ензима върху NORIT, имобилизирането му провеждахме в статични условия в серии от по 2 ml разтвор на HRP във фосфатен буфер (рН=7,00) с концентрации съответно: 0,2 mM; 0,15 mM; 0,1 mM; 0,05 mM; 0,02 mM; 0,01 mM; 0,005 mM; 0,002 mM и 0,001 mM, към които бяха добавяни по 20 mg носител. Адсорбцията се извършваше 24 часа. Количеството на адсорбирания ензим определяхме спектрофотометрично по намаляване концентрацията на HRP в разтвора след адсорбцията. Спектрофотометричните изследвания извършихме на спектрофотометър Specord UV VIS. Количеството HRP в разтвора определяхме на базата на калибровъчна графика за максимумите при дължини на вълната  $\lambda_{max}=205\ nm$  и  $\lambda_{max}=278\ nm$ . Линеината зависимост на светлинната абсорбция при дължина на вълната  $\lambda_{max} = 205\ nm$  от концентрацията на HRP се спазва в интервал от  $0,5 \cdot 10^{-6}\ M$  до  $2,6 \cdot 10^{-6}\ M$ , а при  $\lambda_{max}=278\ nm$  – в интервала  $2,6 \cdot 10^{-6}\ M$  до  $3,6 \cdot 10^{-5}\ M$  и повече.

Спектрални определения в ултравиолетовата област се извършваха със спектрофотометър Specord UV VIS (Carl Zeiss, Jena) и кварцови кювети,  $l=1\ cm$ .

## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

На Фиг. 1 е представена зависимостта на адсорбираното количество пероксидаза от концентрацията на ензима в буферния разтвор. Тази зависимост следва линеен ход при ниски ензимни концентрации – до около  $3,5 \cdot 10^{-5}\ M$ , като

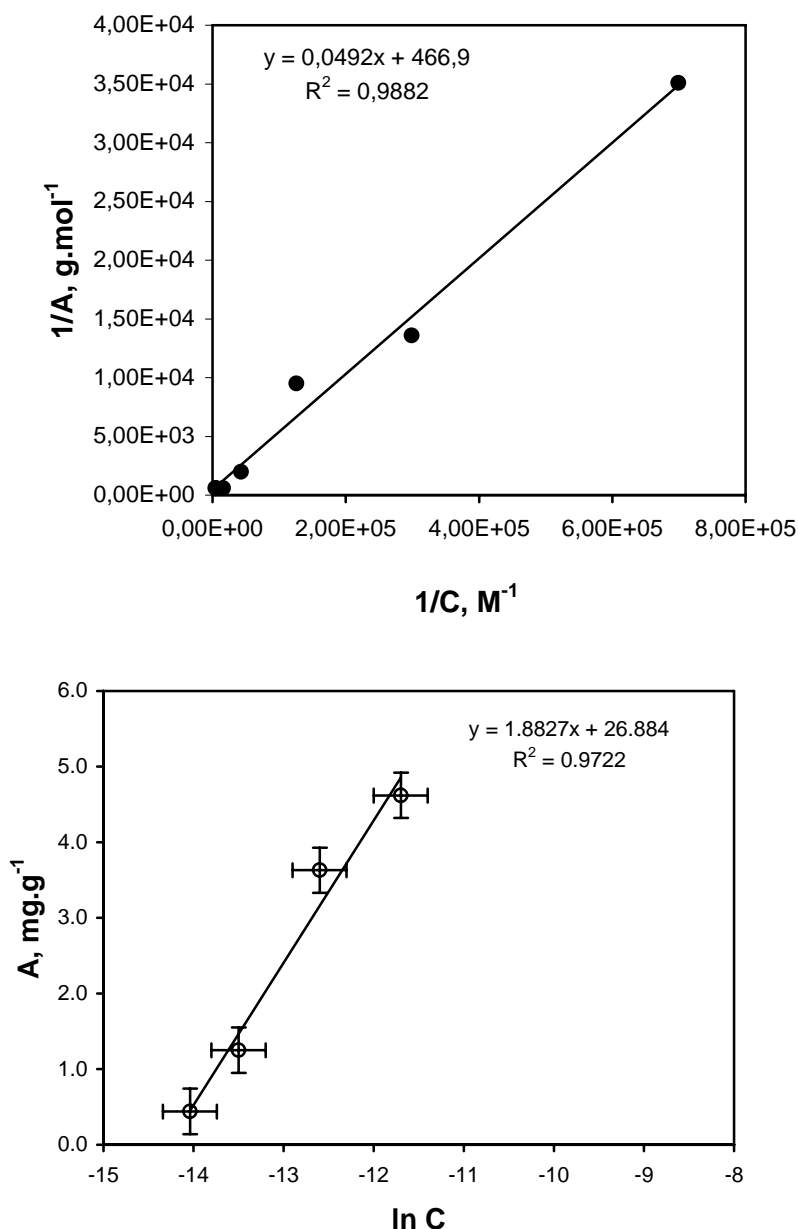
с повишаване ензимното съдържание в изходния разтвор преминава в крива и достига насищане при концентрации на пероксидазата около  $1 \cdot 10^{-4}$  М. Аналогични закономерности бяха наблюдавани и при адсорбция на ензима каталаза върху същия дисперсен носител [6].



**Фигура 1.** Зависимост на адсорбираното количество пероксидаза от изходната концентрация на ензима в буферния разтвор при стайна температура.

Анализът на данните, представени на Фиг. 1 показва, че адсорбцията на пероксидазата върху избраният въглероден носител се описва от адсорбционната изотерма на Лангмюир в концентрационния диапазон от  $10^{-5}$  до  $10^{-4}$  М (Фиг. 2-а). За много ниски степени на запълване на повърхността с ензим адсорбцията може да бъде описана и от логаритмичната изотерма на Тьомкин (Фиг. 2-б).

Регресионният анализ на линеаризираната изотерма на Лангмюир позволи определянето на важни характеристики на адсорбционния процес като равновесната константа  $K$  и максималното количество адсорбиран ензим  $A_{\max}$ . За избраните експериментални условия тези два параметъра имат стойности, съответно:  $K = 9,5 \cdot 10^3$ ; и  $A_{\max} = 2,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.g}^{-1}$ . Последната стойност свидетелства за изключително висок адсорбционен капацитет на носителя - активен въглен, по отношение на пероксидазата. Това може да се дължи както на относително ниската молекулна маса на биополимера, така и на факта, че при работното рН молекулата като цяло е електронеутрална и следователно е заела типичната за белтъците глобуларна конформация.



**Фигура 2.** Зависимост на адсорбираното количество пероксидаза от равновесната концентрация на ензима в разтвора: а) в линеаризирани координати на Лангмюир – горе; б) в координати на Тъомкин – долу. Температура 20 °С.

Спазването на адсорбционната изотерма на Тъомкин само за най-ниските степени на запълване показва, че адсорбцията на ензима върху дисперсията носител не е еднократен акт, а вероятно се състои от няколко етапа – заемане на енергетично най-изгодните адсорбционни центрове в началото на процеса, последвано от пренареждане и изменение на конформацията на биополимера с нарастване на степента на запълване. Намерената стойност за фактора на нееднородност (факторът на нееднородност  $f = 0,53$ ) показва, че адсорбцията протича върху енергетично нееднородна повърхност.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изследване адсорбцията на ензима пероксидаза от водни буферни разтвори с рН=7,00 (при което молекулата на биополимера е електронеутрална) върху фино-дисперсен активен въглен бяха установени следните общи закономерности:

- Адсорбцията при стайна температура се описва от изотермата на Лангмюир за интервала от концентрации на изходния ензимен разтвор  $10^{-5} - 10^{-4}$  М;
- Насищане на адсорбента с ензим се наблюдава при концентрации  $\geq 0,1$  mM, при които е определен адсорбционния капацитет на носителя:  $92,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . Изказано е предположението, че тази висока стойност се дължи на глобуларната конформация на ензима при избраните експериментални условия;
- Установено е, че само за микромолярния диапазон от концентрации адсорбцията се подчинява на изотермата на Тъомкин, което свидетелства за адсорбция върху енергетично нееднородна повърхност. Изказана е хипотезата, че промяната на изотермата, описваща адсорбцията в зависимост от концентрацията на ензимния разтвор вероятно се дължи на реорганизиране на ензимните молекули в хода на процеса.

Във всички случаи обаче, фактът, че експерименталните резултати се описват от изотермите на Лангмюир и на Тъомкин сочи, че при адсорбцията на ензима пероксидаза върху активен въглен се образува монослойно покритие на повърхността.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Gorton L, Lindgren A, Larsson T, Munteanu FD, Ruzgas T, Gazarian I (1999) *Anal Chim Acta* 400:91–108
2. Christenson A, Dimcheva N, Ferapontova E, Gorton L, Ruzgas T, Stoica L, Shleev S, Yaropolov A, Haltrich D, Thorneley R, Aust S (2004) *Electroanalysis* 16:1074–1092
3. Ferapontova E, Gorton L (2001) *Electrochem Commun* 3:767–774
4. Ferapontova E, Pughanova E (2002) *J Electroanal Chem* 518:20–26
5. Ferapontova E, Gorton L (2002) *Bioelectrochemistry* 55:83–87
6. Horozova E, Dimcheva N (2004) *CESJ- Chemistry* 2: 627-637
7. E. Horozova, N. Dimcheva(2005) *CESJ- Chemistry* 3: 279-287.

