

УДК 544.478.3+544.022.533

ПОЛУЧЕНИЕ КОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ КРЕМНЕЗЕМА, ЖЕЛАТИНА И ГОМОГЕНАТА ПЕЧЕНИ КУРИЦЫ ДОМАШНЕЙ GALLUS GALLUS ЗОЛЬ-ГЕЛЬ МЕТОДОМ

В.В. Паентко*, А.К. Матковский, Г.Р. Юрченко, Ю.Л. Зуб

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина*

Золь-гель методом синтезированы кремнеземсодержащие композитные материалы, обладающие холинэстеразной активностью. Изучена ферментативная активность нативной и иммобилизованной холинэстеразы в реакции гидролиза ацетилхолинхлорида. Выявлена зависимость активности иммобилизованного фермента от природы его микроокружения.

ВВЕДЕНИЕ

Ферменты, являющиеся биокатализаторами важнейших жизненных процессов, локализованы в различных клеточных структурах, чаще всего – на мембранах [1]. Их природное окружение обеспечивает как устойчивость, так и длительное сохранение активности. Однако решение ряда практических задач (определение поллютантов, синтез лекарственных препаратов) предполагает применение ферментов и ферментативных препаратов в неестественных для них условиях, в средах, которые способствуют их быстрой дезактивации и разрушению. Повысить устойчивость и пролонгировать активность ферментов призваны разработанные многочисленными методами их иммобилизации [2–4]. Выбранный способ иммобилизации должен максимально обеспечить стабильность ферментативного препарата, транспорт определяемого вещества к активному центру фермента, а также надежность регистрации аналитического сигнала (когда стоит аналитическая задача). В последнее время одним из способов сохранения активности препаратов является создание оболочек из природных полимерных материалов (напр., желатин, агар и т.п.), которые формируют микроокружение фермента, близкое к условиям *in vivo* [5].

Задача нашего исследования состояла в разработке способа получения – с помощью золь-гель метода – композита, представляющего собой кремнеземный каркас с внедренной в него

холинэстеразой печени *Gallus gallus*, заключенной в полимерную желатиновую оболочку. В этом случае ферментативный препарат с микроокружением, близким к условиям *in vivo*, приобретает дополнительную защиту от негативного воздействия окружающей среды за счет полимерной оболочки, а кремнеземный каркас придает прочность и обеспечивает удобство при практическом использовании. Предполагаемая область применения таких композитов – аналитическое определение некоторых пестицидов. В качестве источника холинэстеразы нами использован гомогенат печени *Gallus gallus*, который по сравнению с очищенным препаратом имеет ряд преимуществ, а именно: простота получения, низкая стоимость, большая продолжительность сохранения активности [6]. Кроме того, условия формирования кремнеземной матрицы (рН и температура) при иммобилизации биопрепарата можно выбирать такими, которые обеспечивают максимальное сохранение его активности. Добавим, что отсутствие органических растворителей при таком синтезе позволяет избежать и денатурации белков, в том числе ферментов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для синтеза композитов использовали следующие реактивы: силикат натрия (хч), желатин (ГОСТ 11293-89), гомогенат печени *Gallus gallus*, 0.067М раствор Na, К-фосфатного буфера (рН = 6) [7], 1н. раствор хлористоводородной кислоты (хч).

* контактный автор payentko@mail.ru

Методика получения гомогената печени *Gallus gallus*. Для приготовления гомогенатов образцы тканей печени (0.5 г) промывали дистиллированной водой, измельчали, растирали в ступке со стеклянным песком и небольшим количеством дистиллированной воды до получения однородной массы. Растертую массу переносили в колбу, доводили объем жидкости до 40 см³ и оставляли на 30–60 мин. для экстракции. Полученный гомогенат фильтровали через два слоя фильтровальной бумаги. Фильтрат использовался для определения активности и получения иммобилизованных препаратов. Гомогенат готовили в день исследования и хранили на льду [8, 9].

Синтез кремнеземных матриц. Золю SiO₂ готовили, как описано в [10, с. 149–156]. Золю разбавляли водой в соотношениях, указанных в табл. 1, далее подкисляли 1н. хлористоводородной кислотой до pH 6 (образец 1) и добавляли к нему в одном случае буфер (образец 2), а в другом – раствор желатина (образец 3) (табл. 1). Образование гелей наблюдалось примерно через 30 мин. Потом они подвергались старению в течение 24 ч (при 4 °С), а затем измельчались, промывались водой (1 л) и сушились на воздухе. Полученные ксерогели хранились при 4 °С.

Таблица 1. Условия синтеза кремнеземных матриц и композитных материалов (V золя = 10 см³, pH 6)

Образец	V воды, см ³	V буфера, см ³	V (0,3% р-ра желатина), см ³	V гомогената, см ³
1	30	-	-	-
2	20	10	-	-
3	20	-	10	-
1a	20	-	-	10
2a	10	10	-	10
3a	10	-	10	10

Получение композита, содержащего иммобилизованный ферментативный препарат. Предложенная нами схема получения композитных материалов представлена на рис. 1.

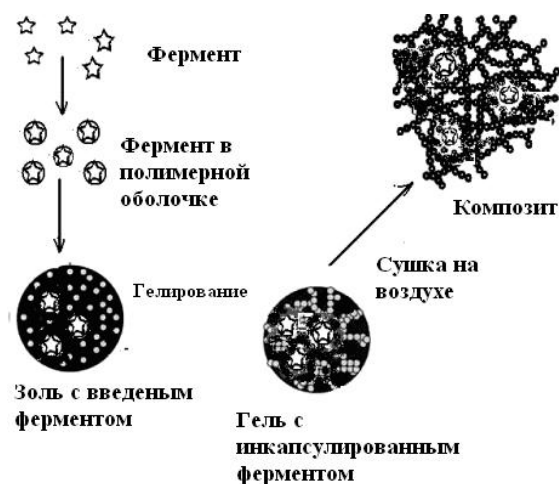


Рис. 1. Схема получения композиционного материала

К золю SiO₂, синтез которого описан выше, прибавляли необходимое количество гомогената (при температуре 25 °С и pH 6) при соответствующем соотношении компонентов (см. образцы 1а–3а, табл. 1).

Обработка образовавшихся гелей проводилась, как описано выше. Полученные композиты также хранились при 4 °С.

Определение структурно-адсорбционных характеристик кремнеземных матриц. Для определения этих характеристик получали изотермы адсорбции-десорбции азота при температуре его кипения на приборе “Kelvin-1042” (Costech Microanalytical). Температура дегазации образцов в токе газа-носителя (гелия) составляла 110–120 °С.

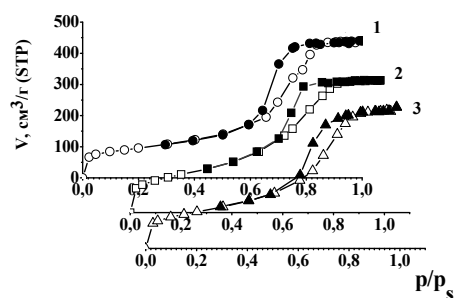


Рис. 2. Изотермы низкотемпературной адсорбции-десорбции азота образцов 1, 2 и 3 (после удаления полимера)

С целью выяснения влияния вводимого желатина на пористую структуру матрицы были получены изотермы адсорбции-десорбции азота для образца, синтезированного следующим образом: образец 3 обрабатывался раствором,

состоящим из перекиси водорода и азотной кислоты, для удаления полимера из пористого пространства матрицы путем его мягкого окисления. Упомянутый раствор готовили путем добавления по каплям 60 %-ой H_2O_2 в раствор равных объемов концентрированной HNO_3 и H_2O . Соотношения перекиси водорода и азотной кислоты составляло 1 : 1. Последующая отмывка и сушка этого образца велись аналогично остальным.

Таблица 2. Структурно-адсорбционные характеристики полученных матриц

Образец	$S_{уд}$, м ² /г*	V_c , см ³ /г**	$d_{пор}$, нм***	Истинная плотность d (по бензолу), г/см ³
1	330	0.68	8.2	2.11
2	440	0.66	6.0	2.2
3	7	-	-	-
3 (после удаления полимера)	455	0.77	6.8	2.16
3а	5	-	-	-

* по методу ВЕТ [13];

** по количеству адсорбированного азота при давлении насыщенных паров;

*** по методу ВЖН [14].

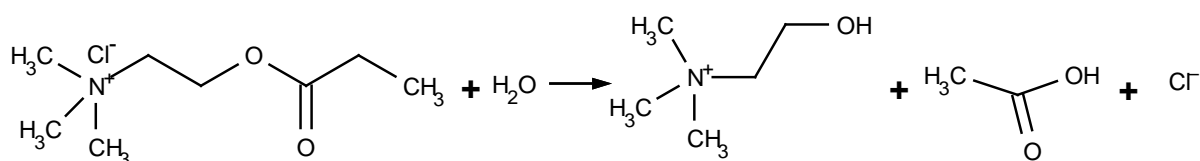


схема 1

Таблица 3. Константы скорости реакции (K) холинэстеразного гидролиза ацетилхолинхлорида и величины достоверности аппроксимации (R^2)

Образец	K, моль*л ⁻¹ мин ⁻¹	R^2
нативный препарат (гомогенат печени курицы домашней Gallus gallus)	0.35×10^{-4}	0.90
1а	0.25×10^{-4}	0.99
2а	0.7×10^{-4}	0.98
3а	0.4×10^{-4}	0.95

Полученные изотермы приведены на рис. 2, а в табл. 2 – результат и обработки, а именно, параметры пористой структуры образцов. Там же в качестве дополнительной характеристики кремнеземной матрицы приведена ее истинная плотность, которая определялась пикнометрическим методом с использованием бензола в качестве пикнометрической жидкости [11, 12]. Эти данные подтверждают наличие кремнеземной матрицы после мягкого окисления композита.

Определение активности свободной и иммобилизованной холинэстеразы (ХЭ) в реакции расщепления ацетилхолинхлорида.

Для образцов 1а–3а с иммобилизованной ХЭ изучалась их каталитическая активность в реакции гидролиза ацетилхолинхлорида (оптимального субстрата ХЭ) [15]. Активность ХЭ определяли по количеству образовавшегося продукта (уксусной кислоты, см. схему 1) за единицу времени. Методом потенциметрического титрования 0.1 н. раствором NaOH проводилась количественная оценка выделившейся кислоты.

Подготовка субстрата состояла в его растворении в 0.15 М растворе KCl, имеющего нейтральное значение pH. Раствор ацетилхолинхлорида готовили непосредственно перед исследованием. Концентрацию субстрата контролировали титрованием кислоты, образовавшейся при полном холинэстеразном гидролизе. Об активности судили по константе скорости ферментативной реакции.

Растворы фермента и субстрата инкубировали 10 мин при 25 °С, далее быстро смешивали. Реакцию останавливали через выбранные промежутки времени путем добавления прозерина. Начальную скорость процесса определяли во временном интервале 3–5 мин. Количество выделившейся кислоты за соответствующие промежутки времени устанавливали методом потенциометрического титрования на высокоточном титраторе АТП-02 ("Аквилон", РФ). Были рассчитаны константы скорости гидролиза ацетилхолинхлорида, являющиеся мерой активности фермента. Полученные экспериментальные данные представлены в табл. 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные композиты 1а–3а (табл. 1) представляют собой кремнеземные матрицы со встроенной ХЭ. В случае образца 3а ферментативный препарат инкапсулирован в желатиновую оболочку (рис. 1). Поскольку глобулярный каркас композитов 1а–3а формируется в несколько различных условиях (табл. 1), необходимо было выяснить, влияют ли эти изменения на структурно-адсорбционные характеристики матриц. Априори ясно, что если существует такое влияние, то оно может обуславливать и изменение активности гетерогенизованного фермента. Анализ параметров пористой структуры и характера изотерм адсорбции-десорбции азота (рис. 2 и табл. 2) показал, что введение в реакционный раствор желатина не оказывает значительного влияния на строение кремнеземных матриц, поскольку тип изотерм адсорбции образцов 2 и 3 (после удаления полимера) один и тот же (рис. 2), а значения величин удельной поверхности весьма близки. Некоторое увеличение сорбционного объема пор в образце 3 после удаления полимера (табл. 2) может быть связано с более рыхлой упаковкой глобул SiO₂ в присутствии полимера. Следовательно, изменение активности фермента обусловлено иными факторами. Поскольку ксерогель, полученный в присутствии желатина (образец 3 до удаления полимера) и композит с ХЭ в желатиновой оболочке (3а) не

обладают развитой пористой структурой (табл. 2) – в отличие от кремнеземных матриц, можно предположить, что фермент с желатином занимают пористое пространство кремнезема.

Холинэстераза катализирует гидролиз субстратов (сложных эфиров) с образованием соответствующих спиртов и кислот (см. схему 1). В случае такого субстрата как ацетилхолинхлорид происходит выделение уксусной кислоты. Установление количества выделившейся кислоты за определенные промежутки времени позволило определить скорость реакции, рассчитать константы скорости гидролиза ацетилхолинхлорида и связать с этим величины активности холинэстеразы.

Для определения констант скоростей (К) реакции гидролиза ацетилхолинхлорида были построены графические зависимости количества выделившейся уксусной кислоты от времени протекания процесса (рис. 3). Как видно из этого рисунка, во всех случаях экспериментальные точки удовлетворительно ложатся на прямую (величины достоверности аппроксимации R² приведены в табл. 3), что свидетельствует о независимости скорости реакции (V) от времени (τ). Следовательно, реакция имеет нулевой порядок, для которого V = K.

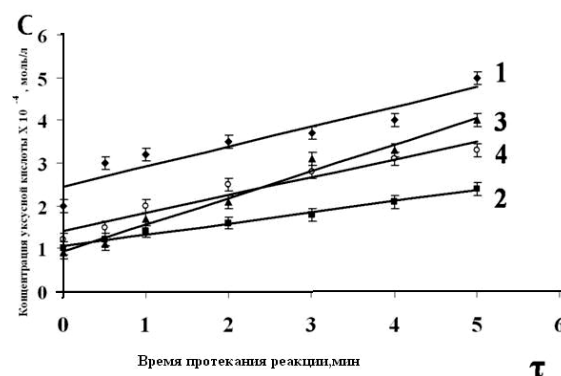


Рис. 3. Зависимость количества выделившейся кислоты от времени реакции: 1 – нативный препарат, 2 – образец 1а, 3 – 2а и 4 – 3а

Сравнение констант скоростей (табл. 3), которые являются мерой активности фермента, для нативного препарата и исследуемых композитов показывает, что имеет место как повышение, так и уменьшение значения К. В [16] отмечается, что уменьшение активности при иммобилизации ХЭ методом включения связано с наличием затруднения диффузии

субстрата к активному центру фермента. По-видимому, это и наблюдается в случае образца 1а (табл. 3). Однако образцы 2а и 3а имеют более высокую активность, чем нативный препарат (табл. 3). В связи с этим заметим, что активность инкапсулированного ферментативного препарата может увеличиваться под влиянием таких факторов, как присутствие вводимых солей буфера и/или хлорида натрия, образующегося при нейтрализации избыточной щелочности раствора силиката натрия [14]. По-видимому, для образца 1а количество соли является недостаточным для преодоления диффузионного затруднения (имеется в виду транспорт субстрата к ферменту), в то время как для образцов 2а и 3а их влияние оказывается значительным. Однако у образца 3а при одном и том же количестве солей по сравнению с образцом 2а наблюдается снижение активности при введении желатина. Это может быть обусловлено снижением транспортной способности субстрата через желатиновую оболочку.

ВЫВОДЫ

Разработана методика получения композитных материалов на основе SiO₂, желатина и гомогената печени Gallus gallus, обладающих холинэстеразной активностью. Изучение каталитической активности полученных гетерогенизированных препаратов в реакции гидролиза ацетилхолинхлорида показало, что в зависимости от микроокружения ферментативного препарата его активность может как возрастать, так и уменьшаться. При наличии в композите Na, К-фосфатного буфера активность фермента возрастает по сравнению с нативным препаратом, а при включении его в желатиновую оболочку несколько снижается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волова Т.Г., Калачева Г.С., Горбунова О.В., Жила Н.О. Динамика активности ключевых ферментов метаболизма полигидроксibuтирата у *Ralstonia eutropha* // Прикл. биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 2. – С. 201–209.
2. Тертых В.А., Янишпольский В.В. Иммуобилизованные на кремнеземах ферменты и их применение // Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния/ под ред. акад. НАН Украины А.А. Чуйко. – Киев: Наук. думка, 2003. – 416 с.
3. Przybyt M., Bialkowska B. Enzyme electrodes constructed on the basis of oxygen electrode with oxidases immobilised by sol-gel technique // Mat. Sci. – 2002. – V. 20, N 2. – P. 36–42.
4. Pierre A.C. The sol-gel encapsulation of enzymes // Biocatal. Biotransform. – 2004. – V. 22, N 3. – P. 145–170.
5. Shchipunov Yu. A. Entrapment of biopolymers into sol—gel-derived silica nanocomposites // Bio-inorganic hybrid nanomaterials / Eds. Ruiz-Hitzky E., Ariga K., Lvov Yu. M. – Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2007. – P. 75–117.
6. Бресткин А.П., Кузнецова А.П., Моралес С.Н. Холинэстеразы наземных животных и гидробионтов. – Владивосток: ГИНРО, 1997. – 466 с.
7. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. – Москва: Химия, 1971. – 456 с.
8. Малинин О.А. Определение фосфорорганических пестицидов // Ветеринария. – 1979. – № 1. – С. 72–77.
9. Грачева И.М., Грачев Ю.П., Мосичев М.С. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. – Москва : Легкая промышленность, 1982. – 240 с.
10. Шабанова Н.А., Саркисов П.Д. Основы золь-гель технологии нанодисперсного кремнезема. – Москва: Академкнига, 2004. – 208 с.
11. Комаров В.С. Адсорбенты и их свойства. – Москва: Наука и техника, 1987. – 248 с.
12. Колосенцев С.Д. Порометрия. – Ленинград: Химия, 1988. – 176 с.
13. Brunauer J.S., Emmet P.H., Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers // J. Am. Chem. Soc. – 1938. – V. 60. – P. 309–319.
14. Barret E.P., Journner J.J., Hallenda P.P. The determination of pore volume and area distributions on porous substances. Competitions from nitrogen isotherms // J. Am. Chem. Soc. – 1951. – V. 73. – P. 373–380.

15. Яковлев В.А. Кинетика ферментативного катализа – Москва : Химия, 1965. – 458 с. помощью ферментативных колориметрических тестов. Автореф. дис. к.х.н. – Казань, 1997. – 20 с.
16. Стойкова Е.Е. Экспресс-определение загрязнителей окружающей среды с

Поступила 01.12.2011, принята 18.01.2012

Одержання композитів на основі кремнезему, желатини і гомогенату печінки курки домашньої *Gallus gallus* золь-гель методом

В.В. Паснтко, О.К. Матковський, Г.Р. Юрченко, Ю.Л. Зуб

*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, payentko@mail.ru*

Золь-гель методом синтезовані кремнеземмісні композитні матеріали, які мають холінестеразну активність. Вивчено ферментативну активність нативної та іммобілізованої холінестерази в реакції гідролізу ацетилхолінхлориду. Виявлена залежність активності іммобілізованого ферменту від природи його мікрооточення.

Preparation of composites based on silica, gelatin and homogenate of the liver of *Gallus gallus* by sol-gel method

V.V. Payentko, A.K. Matkovsky, G.R. Yurchenko, Yu.L. Zub

*Chuiiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine, payentko@mail.ru*

Composite materials with fermentation (cholinesterase) activity have been synthesized by sol-gel method. The fermentation activity has been studied in the reaction of acetylcholinechloride hydrolysis. A dependence has been revealed of the composites activity on the nature of ferment microenvironment.