

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТА ПАНКРЕАТИНА В КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ И СОЗДАНИЕ НА ИХ ОСНОВЕ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ МЕДИ

Воробьева О. В., Филиппова А. М., Аванесян С. С.

(ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет», 355029, г. Ставрополь, просп. Кулакова, 2, e-mail: nastasia.m@list.ru)

Разработан способ иммобилизации фермента панкреатина в композиционные материалы на основе природных полимеров. Представлены данные по изменению удельной активности иммобилизованного фермента в присутствии и отсутствии ионов меди. Показано, что присутствие ионов меди уменьшает удельную активность иммобилизованного фермента. На основании полученных данных получена тест-система для детекции ионов меди в объектах внешней среды. Доказано, что сопутствующие ионы кадмия, железа, свинца не мешают определению ионов меди с помощью разработанной тест-системы. Проведена апробация разработанной биосенсорной тест-системы на модельных системах. Диапазон определяемых концентраций ионов меди с помощью данной тест-системы составляет от 0,02 мг/л до 1,45 мг/л. Разработанная тест-система на основе иммобилизованного фермента панкреатина легка в использовании, не требует дорогостоящего оборудования и специально обученного персонала.

Ключевые слова: тест-система, иммобилизация, панкреатин, ингибитор, удельная активность, фермент, ионы меди.

ENZYME PANCREATINE IMMOBILIZATION INTO COMPOSITE MATERIALS AND DEVELOPMENT ON THEIR BASIS TEST-SYSTEMS FOR DETECTION OF Cu^{2+} IONS RESIDUES

Vorobeva O. V., Filippova A. M., Avanesyan S. S.

FSAEI of HPE North Caucasian Federal University, 355029, Stavropol, Kulakov Avenue, 2, e-mail: nastasia.m@list.ru

The way of enzyme pancreatine immobilization into composite materials on the basis of natural polymers is developed. There are presented the data showing the change of the specific activity of the immobilized enzyme with and without Cu^{2+} ions. It is shown that the specific activity of the immobilized enzyme is reduced with Cu^{2+} ions present. As a matter of record a test-system for detection of Cu^{2+} ions in environment objects is created. It is proved that associated cadmium, iron and lead ions do not interfere with Cu^{2+} ions determining by means of the test-system developed. The developed biosensor test-system is evaluated on model systems. The test system determines the Cu^{2+} ions concentrations in the range from 0.02 mg/l to 1.45 mg/l. The test-system on the basis of the immobilized enzyme pancreatine is easy in use, do not need expensive equipment and specially trained staff.

Keywords: test-system, immobilization, pancreatine, inhibitor, specific activity, enzyme, Cu^{2+} ions.

Введение

На сегодняшний день проблема загрязнения окружающей среды имеет приоритетное социальное и экономическое значение. Отходы производства: газообразные, жидкие и твердые вещества, поступающие в окружающую среду из различных источников, вызывают деградацию среды обитания и наносят ущерб здоровью населения [5].

В качестве токсикантов, нарушающих жизнедеятельность водных организмов и человека, могут выступать ионы тяжелых металлов. Так в результате прямого окисления сульфидов меди кислородом воздуха или сульфатредуцирующими бактериями происходит загрязнение природных гидросистем токсичными ионами меди. Миграция меди в природных поверхностных и грунтовых водах связана с высокой подвижностью ее иона в сульфатных сре-

дах [4]. Источником солей меди могут выступать сельхозугодия, регулярно обрабатываемые медьсодержащими ядохимикатами (например, бордосской жидкостью).

Ферментативные методы анализа являются перспективным направлением в диагностике окружающей среды при проведении эколого-аналитического мониторинга. Высокая селективность и чувствительность к ингибиторам ферментов – загрязнителям окружающей среды является основанием для создания на их основе тест-систем с такими параметрами как: простота и удобство в применении, высокая чувствительность и надежность [3]. Работы по созданию тест-систем на основе иммобилизованных ферментов актуальны и востребованы. Все большее количество ферментов используется при получении уникальных устройств, детектирующих наличие ингибиторов в различных объектах окружающей среды [2].

Цель исследования: разработка тест-системы для обнаружения остаточных количеств ионов меди в объектах окружающей среды на основе высокомолекулярного композиционного материала с иммобилизованным ферментом панкреатином.

Материалы и методы исследования

Для определения амилазной активности растворимого и иммобилизованного фермента панкреатина применяли метод, основанный на использовании в качестве субстрата полисахарида. Суть разработанного метода определения амилазной активности панкреатина состоит в следующем: к 0,1 мл раствора фермента панкреатина (15 мг в 500 мл дистиллированной воды) добавляли 1,6 мл фосфатного буферного раствора (рН 6,9) и термостатировали 30 минут при температуре 37 °С. Параллельно термостатировали 0,1 %-й раствор крахмала, используемого в качестве субстрата, в 0,9 %-ом растворе хлорида натрия. Для постановки ферментативной реакции к анализируемому раствору панкреатина добавляли 1 мл 0,1 % -го раствора крахмала в 0,9%-ом растворе хлорида натрия, смесь инкубировали в течение 5 минут при температуре 37 °С. В качестве контроля использовали смесь, в состав которой вместо раствора фермента вносили 0,1мл 0,9 %-го раствора хлорида натрия. Ферментативную реакцию останавливали, добавляя 0,1 мл 1М раствора соляной кислоты. Остаточное количество крахмала оценивали по сине-фиолетовой окраске с раствором йода на ФЭК–КФК-2 при длине волны 670 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Затем, исходя из оптической плотности, определяли количество крахмала в растворе и рассчитывали удельную активность фермента. Количество расщепленного крахмала определяли по разности экстинкции контрольной и опытной проб с учетом калибровочной кривой в координатах оптическая плотность / количество крахмала (мг).

Активность рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{1000 \cdot m_{кр}}{m_{\phi}}$$

мг крахмала/г фермента, где (1)

$m_{кр}$ – масса расщепленного крахмала, мг;

$m_{ф}$ – масса фермента, мг;

1000 – единица перевода мг в г.

Для иммобилизации фермента панкреатина в структуру композиционного материала была разработана следующая методика. Готовили 3 %-й раствор метилцеллюлозы в воде, выдерживали в течение 12–15 часов. В полученный коллоидный гель метилцеллюлозы вводили реагент для модификации реологических характеристик, 0,03 %-й водный раствор фермента панкреатина, пластификатор и перемешивали до однородного состояния [1].

Моделирование процесса влияния различных факторов на удельную активность ферментов ацетилхолинэстеразы и панкреатина проводилось с помощью программы Statistic V.6 с привлечением метода искусственные нейронные сети (NeuralNetworks).

Результаты исследования и их обсуждение

В основе тест-системы для обнаружения ионов Cu^{2+} в объектах окружающей среды лежит ферментативная реакция с участием фермента панкреатина. В связи с этим, создание оптимальных условий при использовании данной тест-системы предполагало исследование таких факторов, как температура, pH буферного раствора, время ингибирования и время ферментативной реакции.

Для анализа использовали пять экспериментальных серий препарата иммобилизованного фермента панкреатина. Исследуемые пробы имели состав: 1 мл 0,1%-го раствора крахмала в 0,9 %-ом растворе хлорида натрия; 1,6 мл фосфатного буферного раствора (pH = 6,9). В одни пробы добавляли по 0,1 мл раствора композиционного материала (композиционный материал массой 36 мг, содержащий фермент панкреатин массой 0,3 мг, растворяли в 10 мл дистиллированной воды). В другие пробы добавляли по 0,1 мл раствора растворимого фермента (15 мг в 500 мл дистиллированной воды). В опытную пробу добавляли 1 мл 0,0001 %-ого раствора $CuSO_4$ в начале реакции, а в контрольную – в конце реакции. Полученные образцы термостатировали 5 минут при температуре 37 °С.

Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Оптимизация факторов и анализ активности растворимого и иммобилизованного фермента панкреатина

Наименование показателя	Фермент, иммобилизованный в композиционный материал	Фермент без носителя
Удельная активность, (мг крахмала/г фермента) $\times 10^5$	2,73	2,80
Сохранение удельной активности при иммобилизации, %	95-98	100
pH	6,9	6,9
Температура, °C	37	37
Время ингибирования, мин	30	30
Время ферментативной реакции, мин	5	5

Важным аспектом является длительность сохранения каталитической активности ферментного препарата, заключенного в композиции. В этой связи образцы тест-систем хранились в течение 4 месяцев при температурах +4 °C и +20 °C. При этом остаточную активность измеряли один раз в месяц. Для анализа использовали пять экспериментальных серий препарата иммобилизованного фермента панкреатина.

Полученные данные представлены на рисунке 1.

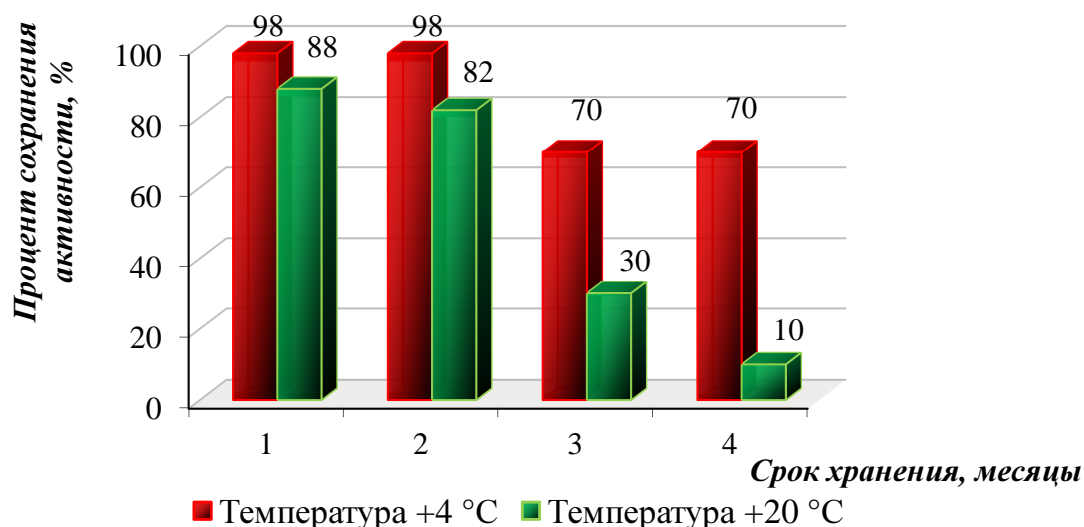


Рисунок 1. Сохранение ферментативной активности панкреатина во времени

Из полученной диаграммы можно сделать вывод: композиции, хранившиеся при температуре +4 °C, к четвертому месяцу хранения имели стабильный процент сохранения биокаталитической активности, а композиции, хранившиеся при температуре +20 °C, потеряли 78 % своей удельной активности.

Были проведены исследования по сохранению удельной активности иммобилизованного и растворимого фермента панкреатина во времени при температуре хранения +4 °C (рисунок 2).

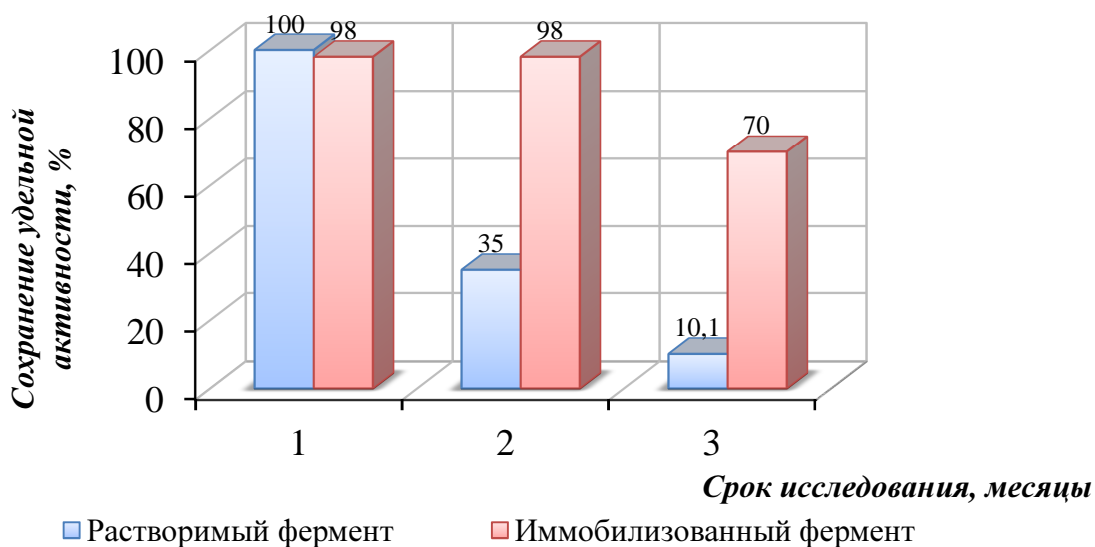


Рисунок 2. Сохранение удельной активности иммобилизованного и растворимого фермента панкреатина во времени

Из графика видно, что к третьему месяцу хранения при температуре +4 °С иммобилизованный фермент сохранил 75 % активности, а фермент, находящийся в растворе, сохранил 8,4 % активности.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при хранении иммобилизованный фермент предотвращает потерю активности по сравнению с ферментом, находящимся в растворе. Это может являться одним из преимуществ, при разработке тест-системы.

На основании полученных данных была разработана тест-система для обнаружения ионов меди в объектах окружающей среды следующего состава: композиционный материал массой 33 мг с иммобилизованным в его структуру ферментом панкреатином массой 0,003 мг.

Для разработки способа обнаружения меди была составлена модельная система, которая представляла собой образцы воды, содержавшие ионы меди в следующих количествах: 0,25 мкг; 2,5 мкг; 25 мкг; 125 мкг; 250 мкг и 375 мкг. Для анализа использовали шесть экспериментальных серий препарата иммобилизованного фермента панкреатина.

Анализ проводили в следующей последовательности. В анализируемую пробу объемом 2,75 мл помещали композиционный материал массой 33 мг с иммобилизованным ферментом массой 0,003 мг и термостатировали 30 минут при +37 °С. Затем прибавляли 1,6 мл буферный раствор (рН = 6,9) и 1 мл 0,1 %-го раствора крахмала, используемого в качестве субстрата. Смесь инкубировали в течение 5 минут. По истечении времени реакцию останавливали подкисленным раствором индикатора йода (раствор, приготовленный разведением в 50 раз 0,2N раствором соляной кислоты основного раствора, состав которого: 2 г йода, 0,66 г

йодида калия в 20 мл воды). Содержание меди определяли количественно на ФЭК-КФК-2 при длине волны 670 нм в кювете толщиной 10 мм.

Полученные данные представлены на рисунке 3.

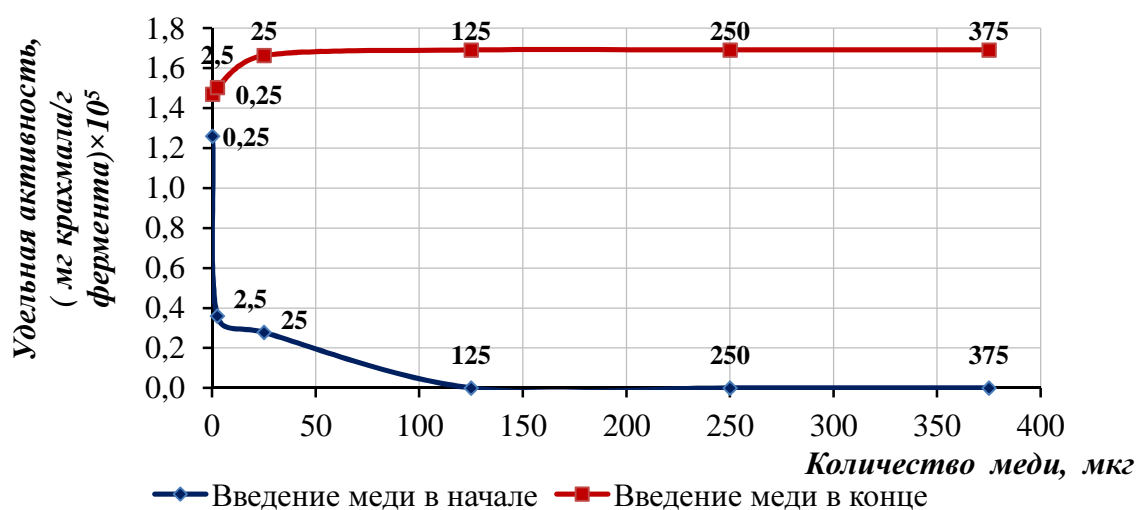


Рисунок 3. Определение ионов Cu^{2+} с помощью разработанной тест-системы на основе иммобилизованного фермента панкреатина

Анализ полученных данных позволил сделать вывод, что 125 мг меди полностью ингибируют 3 мкг фермента панкреатина. При наличии минимально определяемого количества меди в анализируемом растворе удельная активность иммобилизованного фермента панкреатина снижается на 14 %.

В связи с тем, что в объектах внешней среды наряду с ионами меди присутствуют ионы тяжелых металлов: кадмия, железа, свинца и др., было необходимо провести анализ по влиянию сопутствующих ионов на определение меди с использованием разработанных тест-систем. Концентрация вносимых ионов 10 мкг в 1 мл (рис. 4).

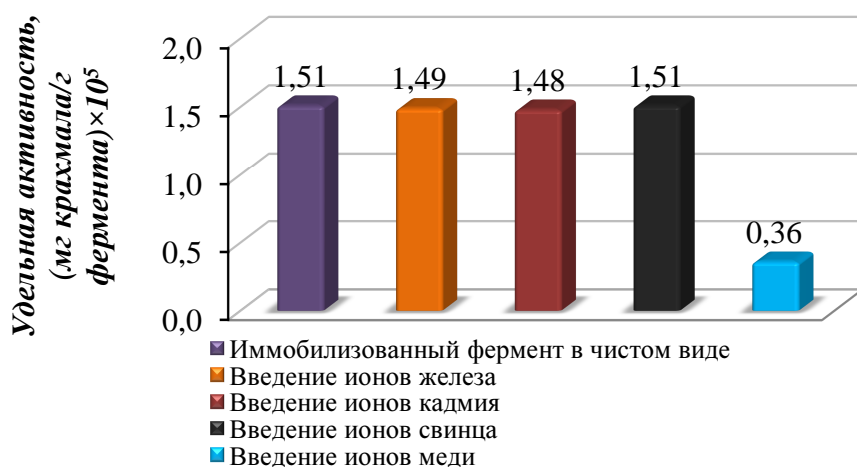


Рисунок 4. Влияние ионов тяжелых металлов на активность иммобилизованного фермента панкреатина

Из графика видно, что определению ионов меди с помощью разработанной тест-системы, не мешают ионы кадмия свинца и железа. Таким образом, данный метод обладает специфичностью в отношении ионов меди.

Заключение

С целью построения тест-системы для обнаружения остаточных количеств ионов меди была проведена иммобилизация фермента панкреатина в композиционные материалы и оптимизированы основные параметры, влияющие на проведение анализа: pH среды – 6,9; температура – 37 °С; время ингибирования – 30 минут; время постановки ферментативной реакции – 5 минут. На основании результатов исследования установлено, что иммобилизованный фермент панкреатин, хранившийся при температуре +4 °С, к четвертому месяцу сохранил 70 % каталитической активности, а хранившийся при температуре +20 °С, потерял 78 % активности. Исследования по сохранению активности фермента во времени показали, что после 3 месяцев хранения фермент в растворе сохранил 10,1 % удельной активности, а иммобилизованный фермент сохранил 70 % удельной активности. На основе полученных данных разработана тест-система с иммобилизованным ферментом панкреатином для детекции ионов меди в объектах внешней среды.

Проведенные исследования показывают, разработанный метод обнаружения ионов Cu^{2+} с использованием тест-системы на основе фермента панкреатина, иммобилизованного в композиционные материалы, обладает специфичностью и высокой чувствительностью. Диапазон определяемых концентраций с помощью данной тест-системы составляет от 0,02 до 1,45 мг/л. При наличии минимально определяемой концентрации ионов меди удельная активность иммобилизованного фермента снижается на 14 %. Определению меди не мешают сопутствующие ионы кадмия, железа и свинца. Анализ позволяет проводить детекцию меди на уровне предельно допустимой концентрации меди в объектах внешней среды, а также не требует большого объема исследуемой пробы.

Список литературы

1. Воробьева О. В., Иванова А. М., Аванесян С. С., Волосова Е. В., Андрусенко С. Ф. Модификация природных полимеров для синтеза материалов подвергающихся биodeградации // Химия в интересах устойчивого развития. – 2011. – № 19. – С. 137–140 (из перечня ВАК ведущих рецензируемых научных журналов и изданий).
2. Евтюгин Г. А. Электрохимические биосенсоры на основе холинэстеразы для группового определения токсикантов и диагностики загрязнения объектов окружающей среды: Автореф. дис. ... д-ра хим. наук: 02.00.02. – Саратов, 1999. – 401 с.

3. Ильичева Н. Ю., Бейлинсон Р. М., Медянцева Э. П., Будников Г. К., Ванягина О. Н. Холлинэстеразные биосенсоры для определения гербицида пропанила // Вестник Московского университета. Сер. 2. Химия. – 2002. – Т. 43. – № 6. – С. 409–413.
4. Патент РФ № 2182131, С02F1/62, С02F1/28. Способ локализации техногенной меди.
5. Ушаков И. Б., Володин А. С., Губин В. В., Фесенко В. В., Прокопенко Ю. И. Медицинские последствия химических загрязнений окружающей среды и некоторые решения данной проблемы // Экология человека. – 2003. – № 4. – С. 3–7.

Рецензенты:

Орлова Ирина Георгиевна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник по специальности, профессор кафедры медицинской биохимии, клинической лабораторной диагностики и фармации ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь.

Лодыгин Алексей Дмитриевич, доктор технических наук, доцент, заведующий кафедрой прикладной биотехнологии ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь.