

Применение методов химической иммобилизации для получения высокоэффективных ферментных катализаторов на основе анодных пленок пористого оксида алюминия

Бородинов Николай Сергеевич, студент 2 курса, МГУ им. М.В. Ломоносова, Факультет наук о материалах, Москва, Россия, ns-borodinoff@yandex.ru

В последнее время в связи с бурным развитием наук о жизни особую актуальность приобрело использование биологически-активных компонентов для создания функциональных материалов и устройств нового поколения. Иммобилизация, т.е. закрепление белков на неподвижной матрице, сегодня широко используется в науке и технологии для формирования высокочувствительных биологических сенсоров и промышленных катализаторов. При этом одним из основных требований, предъявляемых к таким системам, является технологическое удобство использования, в частности, для обеспечения высокой эффективности катализатора при меньшей стоимости, а также возможность организации проточных реакций. В связи с этим наибольший интерес представляют мембранные катализаторы, содержащие биологически-активные компоненты. Одним из наиболее перспективных мембранных материалов является пористый оксид алюминия. Мембраны пористого оксида алюминия обладают высокой проницаемостью и степенью однородности каналов по размерам, что обеспечивает высокую эффективность ферментативного катализа за счет экспозиции белка на поверхности поры.

В связи с этим целью настоящей работы является создание и изучение каталитических свойств биоконпозитов пористый оксид алюминия/фермент. В качестве фермента для иммобилизации была выбрана пероксидаза, катализирующая разложение пероксида водорода, как хорошо изученный, доступный и активно используемый в лабораторной практике белок. Мембраны пористого оксида алюминия с различным размером пор были получены методом анодного окисления. Используя методы химической иммобилизации осуществлен синтез композита пероксидаза/оксид алюминия с различным расстоянием между порами. Были произведены измерения каталитической активности, показавшие перспективность применения изучаемых бионаноконпозитов в качестве высокоэффективных каталитических реакторов. При этом не было выявлено зависимости каталитической активности мембраны от диаметра пор. Измерения стабильности полученных образцов позволяют утверждать о возможности сохранения каталитических свойств образцов при хранении образца под слоем буферного раствора.

Бородинов Николай Сергеевич, студент 3 курса Факультета наук о материалах Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова

Руководитель: к.х.н. ассистент Елисеев Андрей Анатольевич

Данная работа будет представлена на Втором Международном конкурсе научных работ молодых ученых в области нанотехнологий

Рецензия-рекомендация
научного руководителя на научную работу
Бородинова Н.С.

"Применение методов химической иммобилизации для получения
высокоэффективных ферментных катализаторов на основе анодных
пленок пористого оксида алюминия"

Студент второго курса Бородинов Н.С. выполнял научную работу в лаборатории неорганического материаловедения на кафедре неорганической химии МГУ. За это время он проявил себя как работоспособный студент, способный решать поставленные перед ним научные задачи.

В ходе выполнения научной работы методом анодного окисления были синтезированы образцы пленок пористого оксида алюминия. Для последующей иммобилизации фермента (пероксидазы) в порах пленок Al_2O_3 проводилась модификация внутренней поверхности мембран пористого оксида алюминия триметоксисилилпропилэтилен диамином (*N-3-TPEB*). Затем осуществлялась иммобилизация пероксидазы в порах мембран Al_2O_3 . Таким образом, были получены мембранные катализаторы на основе пероксидазы и проведены испытания каталитической активности иммобилизованного фермента.

Научная работа отвечает самым высоким требованиям, предъявляемым к синтезу и анализу химических соединений. В связи с вышесказанным я, Елисеев Андрей Анатольевич, рекомендую работу Бородинова Н.С. "Применение методов химической иммобилизации для получения высокоэффективных ферментных катализаторов на основе анодных пленок пористого оксида алюминия" на соискание премии имени члена-корреспондента РАН, профессора МГУ Н.Н.Олейникова.

Научный руководитель к.х.н. ассистент Елисеев Андрей Анатольевич

Применение методов химической
иммобилизации для получения
высокоэффективных ферментных
катализаторов на основе анодных пленок
пористого оксида алюминия

Выполнил: студент 3 курса Бородинов Николай

Руководитель: к.х.н. ассистент Елисеев Андрей Анатольевич

Оглавление

Оглавление	4
1. Введение	5
2. Обзор литературы.....	7
3. Экспериментальная часть	10
3.1. Список использованных реактивов	10
3.2. Методика синтеза мембран пористого оксида алюминия.....	10
3.3. Методика модификации поверхности.....	11
3.4. Методика модификации белка	11
3.5. Методика иммобилизации на основе периодата.....	12
3.6. Измерение каталитических свойств биокompозита Al ₂ O ₃ /пероксидаза	13
3.7. HCNS-анализ.....	14
4. Обсуждение результатов	15
4.1. Пористая структура образцов	15
4.2. Характеристика методики иммобилизации	16
4.3. Анализ каталитической активности	18
4.4. HCNS-анализ.....	19
5. Выводы	21
6. Литература.....	22

1. Введение

В последнее время в связи с бурным развитием науки о жизни (Life Science) особую актуальность приобрели материалы, использующие биологически-активные компоненты или направленные на применение в биологии и медицине. При этом основная роль отводится созданию гибридных структур, обладающих ферментативной активностью в сочетании со свойствами и стабильностью неорганических соединений. Имобилизация белков, т.е. закрепление белков на некоторой основе, является широко используемым в промышленности и науке процессом, позволяющим получать высокочувствительные биологические сенсоры и катализаторы. При этом одним из основных требований предъявляемых к таким системам является технологическое удобство использования, в частности, для обеспечения высокой эффективности катализатора при меньшей стоимости, или возможность организации проточных реакций. В связи с этим особый интерес представляют мембранные катализаторы содержащие биологически-активные компоненты. Одним из наиболее перспективных мембранных материалов является пористый оксид алюминия. Мембраны пористого оксида алюминия позволяют достичь высокой проницаемости и степени однородности каналов по размерам, что обеспечивает высокую эффективность ферментативного катализа за счет экспозиции белка на поверхности поры.

Цель данной работы – создание биоконпозитов пористый оксид алюминия/фермент и изучение их каталитических свойств. Синтез композиционного материала осуществляли с помощью ковалентного связывания фермента с неорганической матрицей пористого оксида алюминия. В дальнейшем применяли различные аналитические методы для определения наиболее эффективных условий проведения синтеза. Для определения микроструктуры матрицы использован метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), для определения эффективности иммобилизации применяли элементный анализ на содержание Н, С, N, S (HCNS-анализ). Для измерения активности иммобилизованных ферментов в модельной реакции разложения пероксида водорода использован метод спектроскопии видимого и ближнего ультрафиолетового диапазонов. В качестве перспектив этой работы рассматривается создание биосенсоров на основе пористого оксида алюминия. Для достижения поставленной цели в рамках настоящей работы решались следующие задачи:

- Подготовка матриц пористого оксида алюминия с различным диаметром пор,
- Оптимизация методики иммобилизации фермента,
- Определения каталитической активности полученного биоконпозита,
- Развитие практических приложений исследования.

В качестве белка для иммобилизации использовали пероксидазу хрена, широко используемую в научной практике в качестве модельного объекта.

2. Обзор литературы

Белок – это биоорганический линейный гетерополимер, состоящий из α -аминокислот. В организме человека и животных белки выполняют ряд важнейших функций [1]: структурную (коллаген, кератин), транспортную (гемоглобин), сигнальную (инсулин, фосфоорилазы сигнальных гормональных каскадов), двигательную (кинезин, актинмиозиновые фибриллы), защитную (иммуноглобулины и подобные им рецепторы иммунных ответов), рецепторную (родопсин, различные рецепторы), но наиболее важной является ферментативная, т.е. каталитическая. Белки служат эффективными катализаторами процессов, имеющих место в организме, направляя реакции в необходимом направлении и обеспечивая возможность их протекания.

Использование ферментов зачастую оказывается затрудненным вследствие того, что белки представляют собой взвешенные частицы, которые необходимо отделить от толщи раствора. Общеизвестным решением этой проблемы является *иммобилизация*, т.е. прикрепление белка к субстрату. Впервые иммобилизация была применена во время Второй Мировой войны [2], когда возникла проблема осуществления промышленного процесса расщепления сахарозы на глюкозу и фруктозу, а использовавшаяся до этого серная кислота оказалась недоступной. Существует два основных метода иммобилизации ферментов: физический и химический. В данной работе рассматриваются химические методы иммобилизации как наиболее пригодные для поставленных задач.

Химические методы модификации поверхности позволяют создать прочную связь фермент-субстрат, которая оказывается устойчивой при широком диапазоне pH и концентраций других веществ, что, в свою очередь, обуславливает большую чистоту продукта реакции, меньшее количество технологических сложностей. Однако химическая иммобилизация требует специфических реагентов, более сложного процесса приготовления образца. Также возможна ситуация, в которой молекула субстрата не может напрямую прореагировать с белком, например, из-за отсутствия на поверхности матрицы химических групп, способных прореагировать с белком. Эта проблема разрешается использованием молекул-модификаторов, которые могут прореагировать с образованием ковалентной связи как с носителем, так и с ферментом, осуществляя, таким образом, химическую иммобилизацию. На практике первой стадией, как правило, является осаждение модификатора на поверхность матрицы (модификация поверхности), а последующей – осаждение белка в модифицированный носитель.

Одним из наиболее важных аспектов иммобилизации является выбор матрицы-носителя для белка. К материалу, претендующему на эту роль, предъявляются следующие требования:

- высокая химическая и биологическая стойкость;

- высокая механическая прочность;
- достаточная проницаемость для фермента и субстратов, пористость, большая удельная поверхность;
- возможность получения в виде удобных в технологическом отношении форм (гранул, мембран);
- высокая гидрофильность;
- невысокая стоимость.

Примером широко используемого материала субстрата является мезопористый оксид кремния, в числе достоинств которого сравнительно невысокая стоимость, доступность и удобство в использовании. Имобилизация различных ферментов в матрицы на основе оксида кремния распространена в лабораторной практике [2-4]. Другой группой широко используемых материалов матриц являются различные полимерные материалы [5].

Имобилизация предоставляет в наше распоряжение возможность проводить многие реакции в потоке жидкости, что открывает огромные синтетические и аналитические возможности. Используя иммобилизованные комплексы иммуноглобулинов с ферментами, можно создавать высокоэффективные биологические фильтры, системы глубокой очистки, а также биохимические сенсоры.

Матрица, обладающая неразветвленной системой достаточно длинных сквозных пор, позволяет обеспечить высокую вероятность соприкосновения субстрата и иммобилизованного белка, и, следовательно, высокую эффективность катализа по сравнению с матрицей, обладающей неупорядоченной системой каналов и пор. При этом чрезвычайно важным фактором является характеристика пористой структуры, в которую входят толщина матрицы, форма пор и их взаимное расположение, распределение диаметров пор по размеру, средний диаметр. Использование пористого оксида алюминия позволяет с высокой степенью точности контролировать эти параметры синтезируемой матрицы [6] (Таблица 1). Помимо этих достоинств, носители из пористого оксида алюминия обладают высокой химической и биологической стойкостью. Важно также и то, что технологическая форма получаемых носителей удобна для практических приложений, и стоимость таких матриц сравнительно невелика.

Таблица 1. Зависимость характеристик мембран от условий анодирования

Электролит	Напряжение анодирования, В	Расстояние между порами D_{int} , нм	Толщина внутреннего оксидного слоя $D_{внутр}$, нм	Диаметр пор $D_{п}$, нм	Пористость P , %
0,3 H_2SO_4	25	66	7.2	24	12
0,3 $(COOH)_2$	40	105	9.1	31	8
0,1 H_3PO_4	195	500	54	158.4	9

Для проведения опытов были выбраны образцы с диаметрами пор 25 нм, 31 нм, 130 нм, 160 нм, а в качестве модельного фермента была выбрана пероксидаза – фермент, осуществляющий каталитическое разложение перекиси водорода, образующейся при метаболизме, а также при нейтрализации различных активных форм кислорода (АФК) на кислород и воду. Пероксидаза получила широкое распространение, связанное с ее применением в иммуноферментном анализе и, таким образом, является важным белком в лабораторной практике. Как модельный белок пероксидаза чрезвычайно удобна тем, что в каталитической реакции участвует лишь один реагент – пероксид водорода, разложение которого можно зарегистрировать спектрометрическими методами. Для этого используются специальные вещества – белковые субстраты, которые окисляясь, меняют свои спектрометрические характеристики.

3. Экспериментальная часть

3.1. Список использованных реактивов

Al (фольга толщиной 0,25 мм, 99.99% Sigma-Aldrich), H_3PO_4 , конц (х.ч.), CrO_3 (х.ч.), NaOH (х.ч.), Br_2 (х.ч.), $(CH_3)_2CO$ (ацетон, ч.д.а.), глутаральдегид 8,14% ($C_5H_8O_2$, Sigma-Aldrich), борцианогидрид натрия 95% ($NaBH_3CN$, Sigma-Aldrich), уксусная кислота 25% (CH_3COOH , Sigma-Aldrich), метанол (CH_3OH , 99%, Fluka), этиловый спирт (C_2H_5OH , 99,5% Sigma-Aldrich), пероксидаза *Armoracia rusticana* (970ед/мг, BioChemika), N-[3-(триметоксисилил)пропил]-этилен диамин (97% Aldrich, в дальнейшем будем его называть силан), 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоскислота) (ABTS 9,1 ммоль/л водный раствор Sigma), дигидрофосфат натрия (NaH_2PO_4 , х.ч.), гидрофосфат натрия (Na_2HPO_4 , х.ч.), гваякол ($C_7H_8O_2$, 98%, Sigma), пероксид водорода (H_2O_2 , х.ч.)

Все водные растворы готовили с использованием дистиллированной воды.

3.2. Методика синтеза мембран пористого оксида алюминия.

Исходным материалом для синтеза мембран Al_2O_3 служил алюминий в форме пластин. После отжига в печи при температуре $550^\circ C$ в течении 10 часов (для увеличения размера областей упорядоченности) пластины были отполированы при помощи алмазной пасты до зеркального блеска. Полученные пластинки подвергали анодному окислению при температуре $\sim 1^\circ C$ в течении 24 часов. Полученные мембраны помещали в $\sim 5\%$ раствор Br_2 в метаноле для удаления металлического алюминия. Напряжение анодирования и растворитель были выбраны согласно Таблице 2.

Таблица 2. Условия окисления

Электролит	Напряжение анодирования, В
0,3 М H_2SO_4	25
0,3 М $(COOH)_2$	40
0,3 М $(COOH)_2$	165
0,1 М H_3PO_4	195

Барьерный слой удаляли путем травления образца в 5 % H_3PO_4 при 60°C в течение 10-20 минут, при этом происходит одновременное травление стенок пор, и, следовательно, увеличение диаметра пор. При слишком продолжительном травлении возможно разрушение образца.

3.3. Методика модификации поверхности

Мембрану Al_2O_3 со сквозными порами несколько раз промывали метанолом (5-10 мл), а затем мембрану обрабатывали раствором силана, следующего состава: 94% подкисленного метанола (1мМ уксусной кислоты), 5% дистиллированной воды и 1% силана по объему. При быстром перемешивании к подкисленному метанолу добавляли воду и силан. Ячейку с мембраной заполняли вышеуказанным раствором, затем закрывали с двух сторон и оставляли на 24 часа, после чего мембрану промывали метанолом, поскольку отмывание водным раствором вызывает гидролиз и поликонденсацию непрореагировавшего с поверхностью оксида алюминия силана.

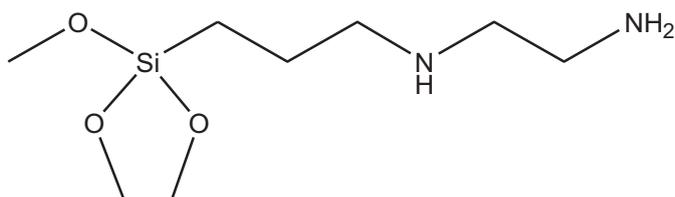


Рис. 1. Схема химического строения силана

Основным химическим процессом, происходящим при модификации поверхности является гидролиз триметоксисилана. При этом скорость смешения реагентов играет важную роль – за счет активности свободных от метильных радикалов гидроксильных групп может происходить поликонденсация силана, что, в конечном счете, приводит к непригодности данного раствора для дальнейшего использования.

3.4. Методика модификации белка

Серьезным отличием пероксидазы *Azorhizobium ciceris* от многих других белков в отношении иммобилизации является наличие на их поверхности объемной «шубы» из полисахаридов, что может обуславливать ограниченную применимость традиционных подходов к иммобилизации в связи с отсутствием аминогрупп на доступной поверхности.

Однако на поверхности полисахаридной «шубы» фермента имеется большое число гидроксильных групп, легко окисляемых под действием периодат-аниона до альдегидных групп,

которые в дальнейшем можно ковалентно связать с поверхностью мембраны Al_2O_3 . Этот подход получил название метода Наканэ[9].

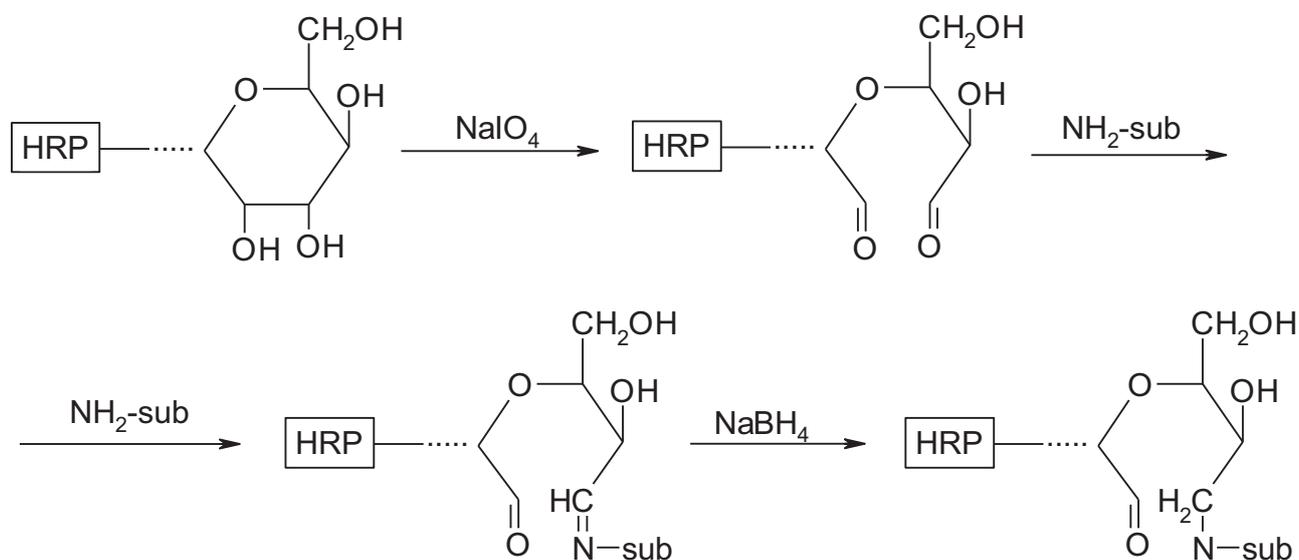


Рис. 2. Метод Наканэ. *HRP* (*horseradish peroxidase*) – пероксидаза *A Armoracia rusticana*, *sub* – символическое обозначение субстрата.

3.5. Методика иммобилизации на основе периодата

0,2 мл 0,1М раствора периодата калия добавляли к 1 мл раствора концентрации 1 мг/мл белка 25мМ в фосфатном буферном растворе (pH=7,3). В процессе этого взаимодействия происходила модификация полисахаридных «хвостов». Раствор выдерживали в течение 20 минут, после чего в среду вводили эквимольный раствор $Na_2S_2O_3$ в связи с высокой чувствительностью белка к наличию окислителей и восстановителей в среде. Этим раствором в смеси с цианоборгидридом пропитывали мембрану в течение 24 часов, после чего измеряли каталитические свойства образца. Роль цианоборгидрида оказывается весьма важной, так как гидролиз оснований Шиффа протекает достаточно интенсивно в кислой и нейтральной средах, и восстановление связи C-N увеличивает стабильность конъюгата субстрат-фермент.

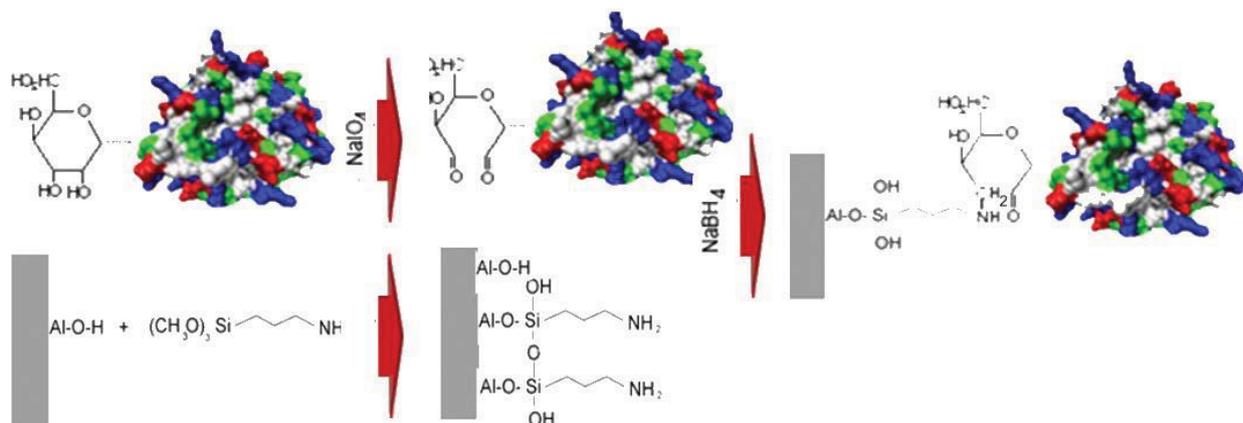


Рис.3. Методика иммобилизации

3.6. Измерение каталитических свойств биокомпозита Al₂O₃/пероксидаза

Каталитические свойства белка характеризуются величиной активности, единицей измерения которой является единица (англ. *unit*). Для каждого белка выбирается свое определение активности, которое связывается с протеканием модельной каталитической реакции. В связи с тем, что такое определение активности пробы постулируется для гомогенных систем, в качестве величины, характеризующей активность мембраны был выбран *процент конверсии*, т.е. отношение количества прореагировавшего субстрата к начальному.

Для пероксидазы определение каталитической активности следующее: одна единица активности катализирует окисление 1.0 микромоля ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоскислота) в минуту при pH 5.0 при температуре 25°C.

В качестве модельного субстрата для измерения каталитических свойств был выбран ABTS как наиболее распространенный субстрат для этого белка. При окислении пероксида водорода избытком субстрата происходит образование производных, обладающих другими спектроскопическими характеристиками (максимум поглощения ABTS – 340 нм, окисленная форма (катион-радикал) – при 414 нм), что позволяет зарегистрировать окисление измерением оптической плотности в видимой и ближней ультрафиолетовой области спектра.

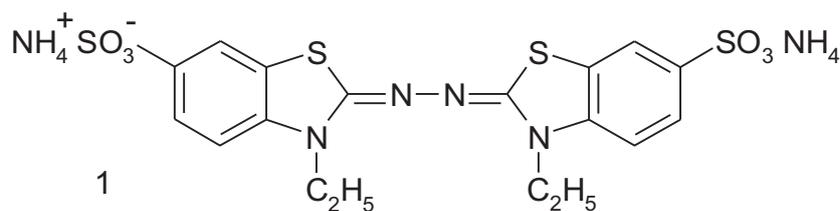


Рис. 4. Структура ABTS

После однократного пропускания смеси 1,45 мл 9,1 ммоль раствора ABTS и 0,05 мл 0,3% перекиси водорода через мембрану Al_2O_3 /пероксидаза при давлении 4 атм фильтрат анализировали на UV-VIS спектрофотометре Perkin-Elmer в интервале длин волн 190-1100 нм. Анализировались пробы, пропущенные через мембрану один раз. Пробоотбор производился до прекращения увеличения поглощения света фильтратом в зависимости от порядкового номера пропущенного раствора субстрата.

Все процессы, связанные с синтезом мембраны и отбором проб для спектроскопического анализа, проводили в тефлоновой ячейке, специально спроектированной для этого процесса. Фильтрацию раствора через мембрану проводили при избыточном давлении газа (азота). Для предотвращения механического разрушения пленки Al_2O_3 под действием газа под мембрану пористого оксида алюминия подкладывали полимерную пористую мембрану (PEEK, Polyetheretherketone, $d=0,5$ мкм),

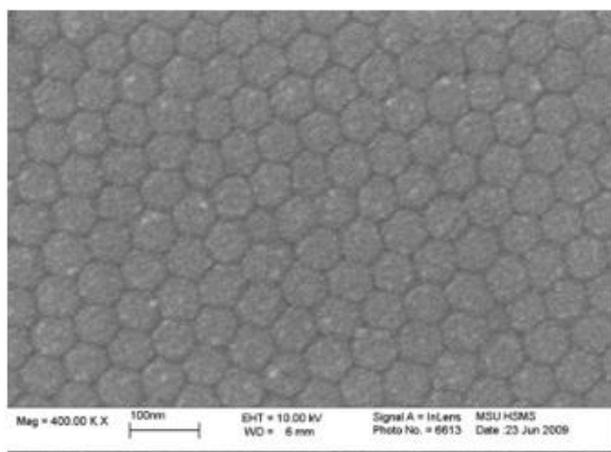
3.7. HCNS-анализ

Для оценки количества иммобилизованного фермента применялся HCNS метод, который проводился на приборе Elementar Vaio MicroCube производства Elementar GmbH, ФРГ. Было проанализировано 3 типа мембран - Al_2O_3 , Al_2O_3 (модифицированная силаном), Al_2O_3 /пероксидаза для каждого диаметра пор.

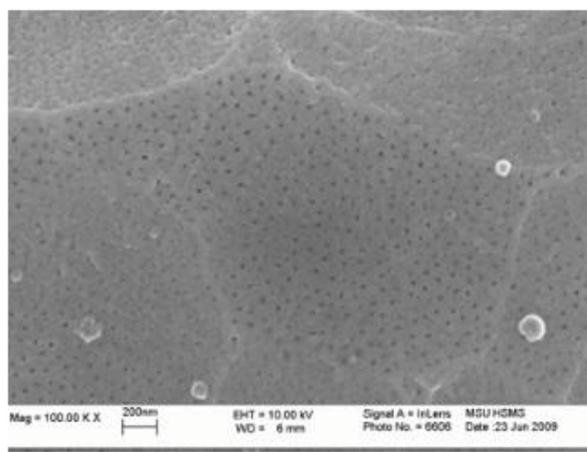
4. Обсуждение результатов

4.1. Пористая структура образцов

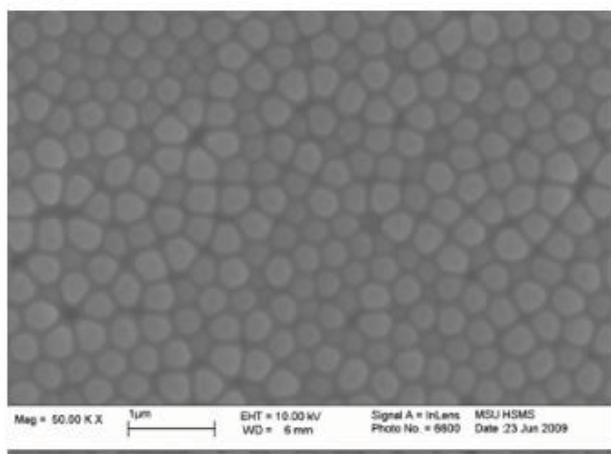
При помощи сканирующей электронной микроскопии были получены микрофотографии внешней поверхности образцов. (Рис. 5). Характеристики пористой структуры приведены в таблице 3, распределения межпоровых расстояний приведены на рис.6.



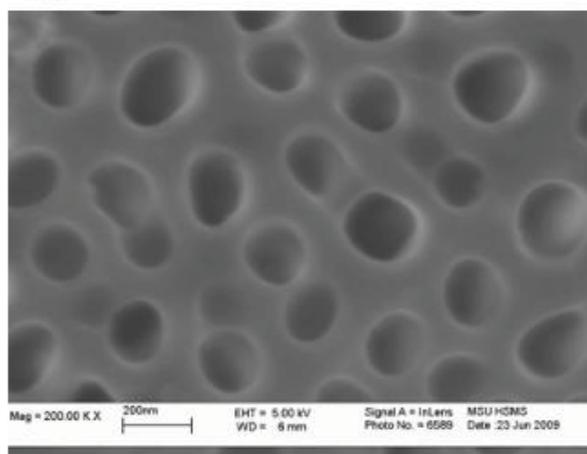
а



б



в



г

Рис.5. СЭМ поверхности образцов пленок пористого оксида алюминия: а – 25В, б – 40В, в – 165 В, г – 190В

Таблица 3. Характеристики пористой структуры

Напряжение, В	Межпоровое расстояние, нм	Стандартное отклонение, %	Диаметр, нм
25	65	8	25
40	107	20	31
165	360	13	130
195	480	15	160

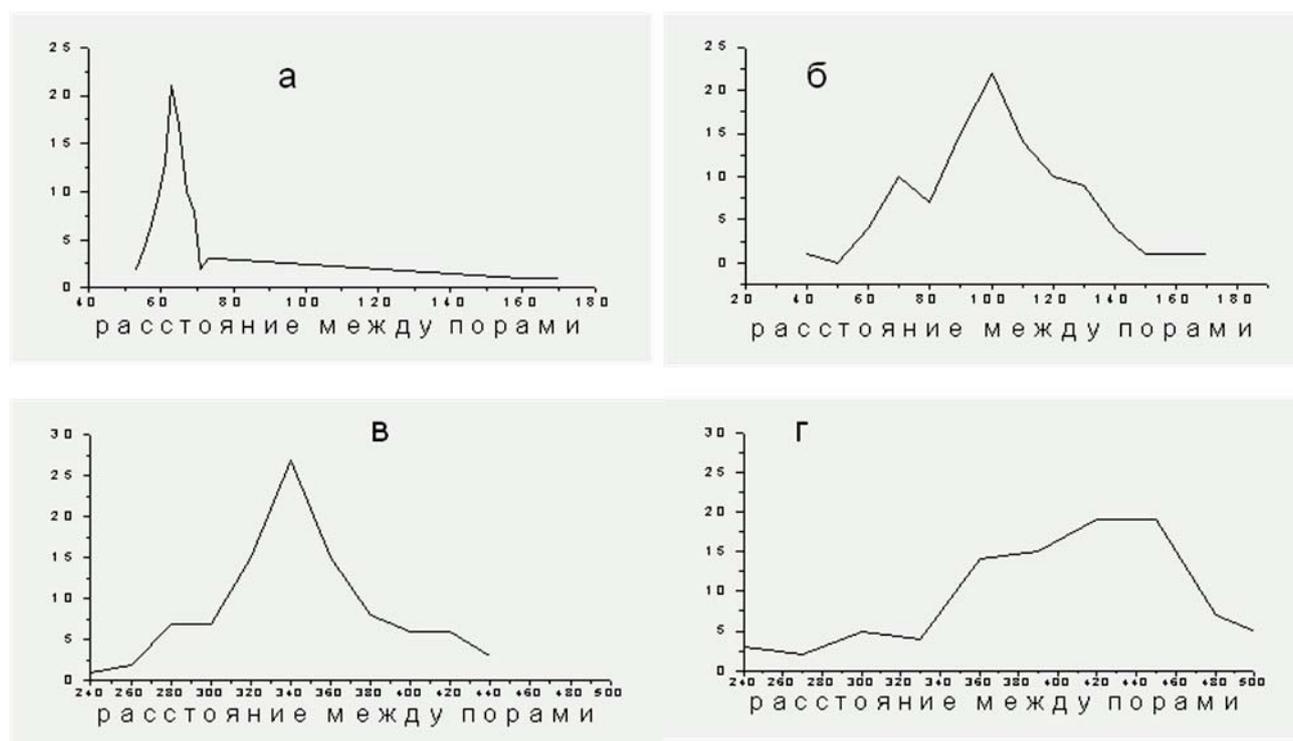


Рис.6. Распределение расстояния между порами для образцов: а – 25В, б – 40В, в – 165 В, г – 190В

4.2. Характеристика методики иммобилизации

После проведения иммобилизации мембрану промывали фосфатным буферным раствором для удаления физически адсорбированной пероксидазы. Очевидно, что эффективность иммобилизации, т.е. количество оставшегося в мембране фермента после многократного промывания буфером, зависит в первую очередь от прочности связи фермент-субстрат.

Если фермент присутствует в порции субстрата после фильтрования через мембрану Al_2O_3 /пероксидаза, то поглощение света будет меняться с течением времени. Если после многократного промывания фермент оказывается в каждой порции профильтрованного субстрата,

то можно сделать вывод о том, что связь фермент-оксид алюминия отсутствует или является непрочной, напротив, неизменность поглощения свидетельствует о высокой эффективности методики.

На рис.7 приведен график зависимости оптической плотности раствора субстрата при 414 нм после однократного пропускания через мембрану Al_2O_3 /пероксидаза.

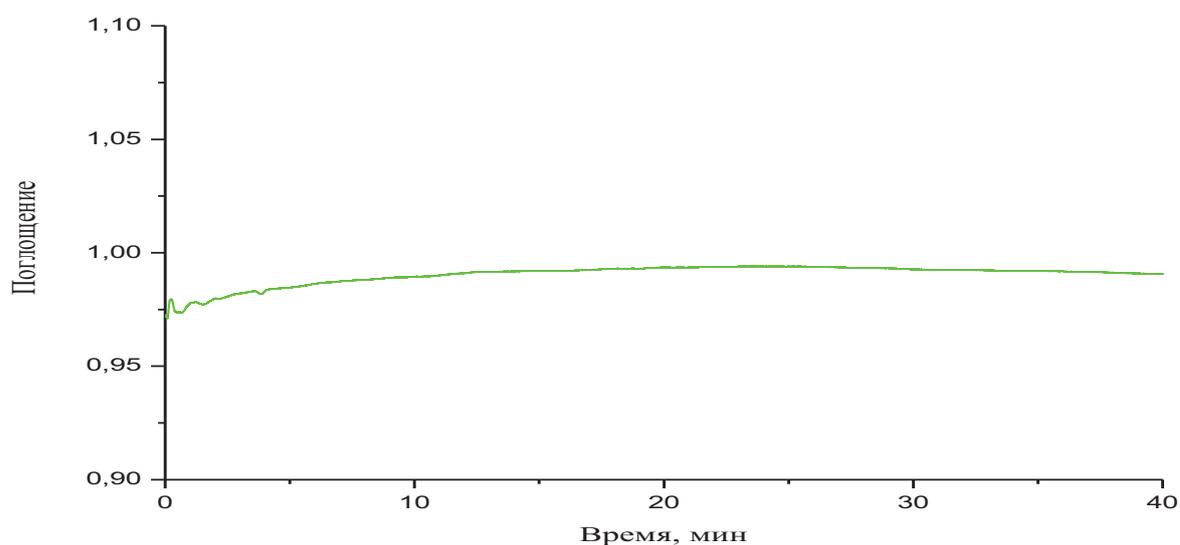


Рис. 7. Зависимость оптической плотности раствора субстрата при 414 нм после однократного пропускания через мембрану Al_2O_3 /пероксидаза.

Как видно из рис. 7, оптическая плотность остается постоянной величиной, что позволяет говорить об о том, что фермент не содержится в пробе, то есть после удаления физически адсорбированного фермента в порах мембраны Al_2O_3 /пероксидаза остаются химически иммобилизованные молекулы белка. Таким образом, методика с использованием периодата оказывается пригодной для иммобилизации пероксидазы *Armoracia rusticana* в порах мембран Al_2O_3 .

4.3. Анализ каталитической активности

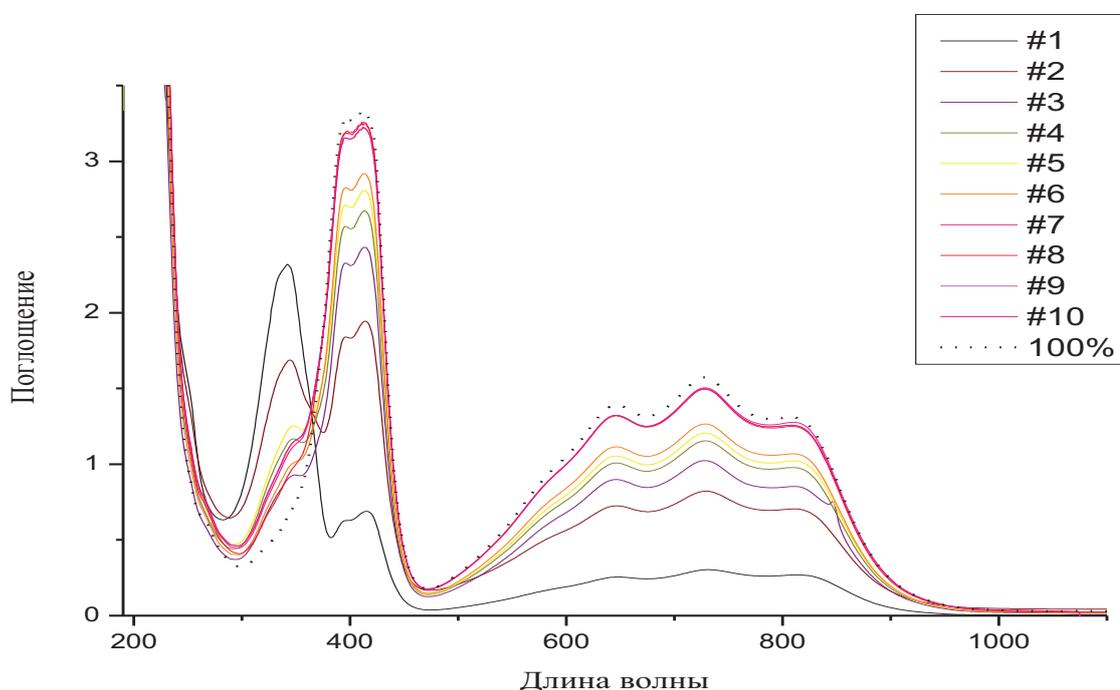


Рис. 8. Спектр серии растворов ABTS с 0,3% перекисью водорода, однократно пропущенных через мембрану.

Как следует из рис.8, содержание окисленного субстрата в зависимости от номера порции оказывается различным, при этом наблюдается тенденция увеличения поглощения в максимуме вплоть до некоторой величины. Вероятное объяснение состоит в том, что сухая (несмоченная изнутри водой) пористая мембрана смачивается раствором постепенно, и первые порции проходят не по всей площади мембраны Al_2O_3 /пероксидаза, а лишь через свободные от фермента поры, что косвенно подтверждается большим временем, необходимым для прохождения первой порции. В дальнейшем используемая площадь возрастает, и раствор субстрата начинает взаимодействовать с белком, находящимся в каналах пенки пор. При этом наблюдается увеличение степени конверсии.

Пик на 340 нм, отвечающий неокисленному ABTS постепенно уменьшается, в то время как пик на 414 нм растет и достигает интенсивности 96% от полностью окисленного раствора ABTS той же концентрации. Это соответствует 95% конверсии ABTS.

Проведенные измерения каталитической активности (см. Таблицу 3) показали некоррелированность диаметра пор и каталитической активности, вне зависимости от пористой структуры, каталитическая активность, приведенная к 10 мкм составила около 10%.

Таблица 4. Каталитическая активность и содержание белка в образцах с различным диаметром пор

Диаметр пор, нм	Конверсия на 10 мкм	Содержание белка
25	8,166667	3,70%
31	11,8797	?
130	10,55556	2,80%
160	9,571429	?

4.4. HCNS-анализ

Согласно данным элементного HCNS-анализа, содержание белка в исследованных образцах не зависит от диаметра пор. К сожалению, на данный момент результаты HCNS-исследований для диаметров пор 31 нм и 160 нм не были получены, однако результаты, полученные для диаметров пор 25 нм и 130 нм, оказались довольно близки и свидетельствуют о содержании белка в поре около 3-4% (см. Таблицу 4).

4.5. Стабильность биокomпозитов пористый оксид алюминия/пероксидаза

Стабильность образцов была изучена в течении 5 дней. Проводилось две серии измерений – в условиях хранения образца в буферном растворе и в условиях хранения на воздухе. Результаты представлены на рис.9. Характер зависимости – это экспоненциально затухание. Для «сухого» способа хранения ежедневно каталитическая активность уменьшается в 3,1 раза, в то время как в условиях хранения в буферном растворе – в 1,2 раза.

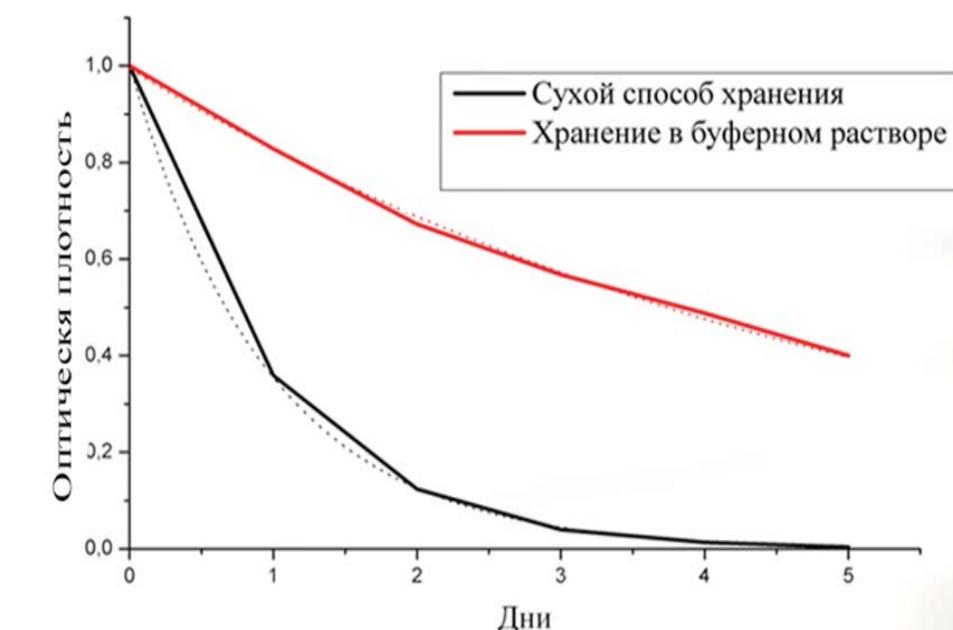


Рис.9. Стабильность биокomпозитов при хранении

Таким образом, для обеспечения большей сохранности каталитической активности биокomпозита его хранение следует производить в буферном растворе.

5. Выводы

Была разработана методика синтеза бионанокompозита пористый оксид алюминия/фермент, включающая в себя синтез мембраны-носителя, модификацию ее поверхности и осаждение фермента в поры матрицы. Эффективность этой методики была экспериментально подтверждена исследованием временной зависимости поглощения света раствором субстрата, пропущенного через мембрану. Результаты измерений каталитической активности позволяют говорить о высокой эффективности синтезированных бионанокompозитов как катализаторов. При этом не было выявлено зависимости каталитической активности мембраны от диаметра пор, величина которой, рассчитанная на 10 мкм толщины пленки, составила около 10%. К сожалению, на данный момент результаты HCNS-анализа не были получены для всех образцов, но имеющиеся данные указывают на массовое содержание белка 3-4%. Измерения стабильности полученных образцов позволяют утверждать о возможности сохранения каталитических свойств образцов при хранении образца под слоем буферного раствора. Это позволяет говорить о применимости исследованных мембран в различных синтетических и аналитических приложениях.

6. Литература

1. В. Эллиот, Д. Эллиот. Биохимия и молекулярная биология. М.: МАИК, Наука/Интерпериодика, 2002.
2. D. Allan, Immobilization of enzymes on nanoporous silica, Ph.D., доступен на www.sciencedirect.com, 2004.
3. J. M. Kisler, G. W. Stevens, A. J. O'Connor, Adsorption of proteins on mesoporous molecular sieves, *Mater phys. mech.*4 (2001) 89-93 .
4. Д.Л. Григорьева, И.А. Веселова, Т.Н. Шеховцова, Определение ртути (II) с использованием пероксидазы, ковалентно иммобилизированной на модифицированных силикагелях, *Вестник Московского университета*, сер.2, Химия том 44 №1, 2003.
5. А.А. Белов, Л.А. Белова, В.Н. Филатов, Е.Н. Белова, Г.Н. Донских, М.Н. Горбунова Взаимодействие ингибиторов протеиназ плазмы крови с иммобилизованным на диальдегидцеллюлозе протеолитическим комплексом из гепатопанкреаса краба, *Вестник Московского университета*, сер.2, Химия том 44 №1, 2003.
6. V. Grasso V. Lambertini, P. Ghisellini, F. Valerio, E Stura, P. Perlo and C. Nicolini, Nanostructuring of a porous alumina matrix for a biomolecular microarray, *Nanotechnology* **17** (2006) 795–798.
7. Zh. Yang, Shihui Si, H. Dai, Ch. Zhang, Piezoelectric urea biosensor based on immobilization of urease onto nanoporous alumina membranes, *Biosensors and Bioelectronics* **22** (2007) 3283–3287.
8. Y. Xian, M. Liu, Q. Cai, H. Li, J. Lu, L. Jin, Preparation of microporous aluminium anodic oxide film modified Pt nano array electrode and application in direct measurement of nitric oxide release from myocardial cells, *The Analyst* 2001, 126, 871–876.
9. А.М.Егоров, А.П.Осипов, Б.Б.Дзантиев Е.М.Гаврилова, Теория и практика иммуноферментного анализа, М.: Высшая школа, 1991