



УДК 577.158.59.036

**ИММОБИЛИЗАЦИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ НА ПОВЕРХНОСТИ
ФТОРОПЛАСТА. ВЛИЯНИЕ ПОНИЖЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ
И ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА КИНЕТИКУ ФЕРМЕНТАТИВНОГО
ОКИСЛЕНИЯ***Сергеев Г. В., Сергеев В. М., Константинова Н. Р.,
Батюк В. А.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Изучено влияние понижения температуры и замораживания на кинетику окисления, катализируемого пероксидазой из хрена, адсорбированной на поверхности фторопласта-4. В результате адсорбции происходит существенное уменьшение активности фермента и снижение энергии активации окисления ферроцианида калия в жидкой фазе с 52,3 до 29,3 кДж/моль, что связано, по-видимому, со структурными изменениями фермента. В замороженных растворах скорость реакции, катализируемой свободным и иммобилизованным ферментом, максимальна при 263 и 268 К соответственно. Сдвиг температурной зависимости и уменьшение скорости реакции, катализируемой иммобилизованным ферментом, во льду связаны с возникающими при замораживании диффузионными затруднениями.

Реакции, катализируемые адсорбционно-иммобилизованными ферментами, происходят в области раствора, возмущенной влиянием поверхности носителя. На возможность подобного влияния указывают аномальные свойства воды, находящейся на границе раздела твердое тело — вода [1], лед — воздух [2], в замороженных водных суспензиях различных органических и неорганических веществ [3], в порах адсорбентов [4] и входящей в состав животных и растительных клеток [5, 6]. Аномалии поведения воды, фазовая гетерогенность, наличие развитой поверхности раздела фаз и неравномерность распределения компонентов между фазами являются свойствами, общими для структурированных живых систем и замороженных растворов.

В основе качественного, а в некоторых случаях и количественного описания закономерностей протекания химических и биохимических реакций в замороженных растворах лежит структурно-кинетическая модель [7]. Согласно этой модели, механизм реакций при замораживании не изменяется, а сами реакции осуществляются в областях незамерзшего растворителя, где концентрируются все растворенные вещества. Физико-химические свойства раствора в таких областях отличаются как от свойств твердой матрицы замерзшего растворителя, так и от свойств незамерзшего раствора. В литературе высказывалось также предположение о влиянии поверхности раздела фаз на кинетику реакций во льду [8].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния понижения температуры и замораживания на кинетику окисления, катализируемого пероксидазой, адсорбированной на поверхности фторопласта. Ранее было показано, что в замороженных растворах могут осуществляться реакции, катализируемые свободной пероксидазой (окисление фосфорных эфиров гидрохинонов и гваякола) [9, 10] и пероксидазой, ковалентно иммобилизованной на полиакриламидном геле (окисление гваякола) [10]. В обоих случаях для реакции во льду было характерно наличие колоколообразной зависимости скорости от температуры.

В качестве субстрата пероксидазного окисления выбран ферроцианид калия. В жидкой фазе катализируемое свободной пероксидазой окисление ферроцианида перекисью водорода достаточно хорошо изучено [11]. Выбор в качестве носителя фторопласта обусловлен тем, что его поверхность при

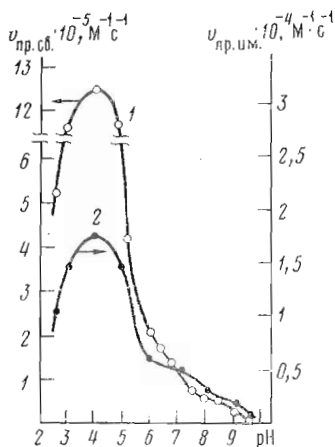


Рис. 1

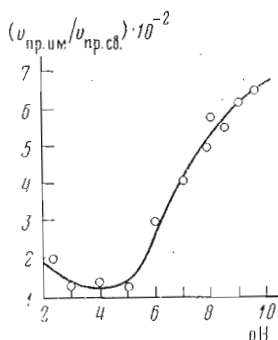


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость от pH среды приведенной скорости окисления ферриоксалата калия перекисью водорода, катализируемого свободной (1) и адсорбированной на поверхности фторопласта (2) пероксидазой. Условия: $[E_{св}]$ 4,9 нМ, $[E_{им}]$ 0,1 мкМ, $[S]$ 98 мкМ, $[H_2O_2]$ 0,18 мМ, 0,067 М фосфатный буфер, 293 К

Рис. 2. Зависимость относительной активности иммобилизованной пероксидазы от pH среды при 293 К

температурах ниже 273К окружена пленкой воды, дающей в спектрах ЯМР узкий сигнал, исчезающий при $T \approx 260K$ [1, 3]. Квазижидкая вода, окружающая гидрофильные поверхности, замерзает при более низких температурах [1]. Сопоставление этих данных позволяет предполагать, что вода, находящаяся вблизи поверхности фторопласта, при $T < 273K$ в структурном отношении приближается ко льду.

Исследование окисления ферриоксалата калия перекисью водорода, катализируемого свободной и адсорбированной на поверхности фторопласта пероксидазой при различных значениях pH показало (рис. 1), что иммобилизация фермента сопровождается значительной потерей его активности. Относительная активность иммобилизованной пероксидазы, характеризуемая отношением приведенной скорости катализируемой ею реакции ($v_{пр.им}$) к соответствующей скорости для свободной пероксидазы ($v_{пр.св}$), существенно зависит от pH среды (рис. 2).

Если исключены или учтены ограничения скорости, связанные с внешней или внутренней диффузией субстрата, изменение ферментативной активности при адсорбции белков на поверхностях твердых тел обычно связывают с существенными для катализа нарушениями структуры белковой глобулы [12, 13]. Энергичное перемешивание позволяет в известной мере устранить торможение, связанное с диффузией субстрата из объема к поверхности носителя. Сравнительно малая удельная поверхность использованного в работе фторопласта указывает на отсутствие пор, что, по нашему мнению, позволяет не учитывать вклад внутренней диффузии. Хотя причины влияния поверхности фторопластовой подложки на структуру пероксидазы специально не изучалось, наблюдаемое уменьшение активности фермента при его иммобилизации, по-видимому, и в этом случае можно связать с затрагивающими активный центр структурными изменениями ее молекулы.

Иммобилизация пероксидазы приводит к заметному снижению экспериментально определяемой энергии активации окисления (рис. 3). Ее значение составляет $52,3 \pm 5,4$ и $29,3 \pm 7,5$ кДж/моль для реакций, катализируемых свободным и иммобилизованным ферментом соответственно. Факты изменения активационных параметров реакций при иммобилизации ферментов, известные из литературы [14], связываются с конформационными изменениями белковых глобул. В случае пероксидазы, адсорб-

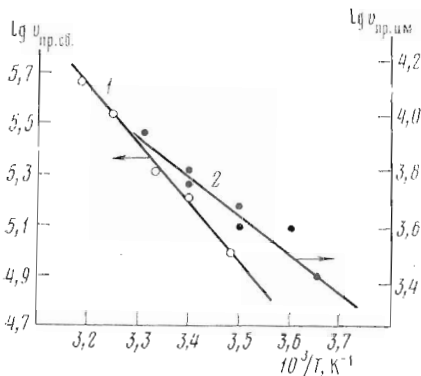


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость от температуры приведенной скорости окисления перекисью водорода ферроцианида калия в водных растворах, катализируемого свободной (1) и адсорбированной на поверхности фторопласта (2) пероксидазой. Условия: $[E_{св}]$ 1,3 нМ, $[E_{им}]$ 4,5 нМ, $[S_0]$ 98 мкМ, $[H_2O_2]$ 0,18 мМ, 0,067 М фосфатный буфер, pH 6,5 (293 К)

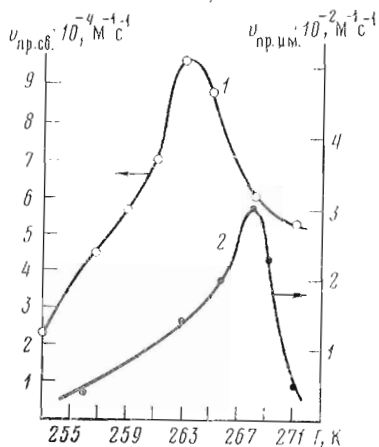


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость от температуры приведенной скорости окисления перекисью водорода ферроцианида калия в замороженных растворах, катализируемого свободной (1) и адсорбированной на поверхности фторопласта (2) пероксидазой. Условия: $[E_{св}]$ 2,0 нМ, $[E_{им}]$ 0,38 мкМ, $[S]$ 98 мкМ, $[H_2O_2]$ 0,18 мМ (концентрация относится к незамороженному раствору при 293 К), 0,067 М фосфатный буфер, pH 6,5 (293 К)

ционно иммобилизованной на поверхности фторопласта, снижение наблюдаемого значения энергии активации может быть вызвано тем, что понижение температуры, ослабляя гидрофобные взаимодействия [15], дает ферменту возможность при более низких температурах принять конформацию, более близкую к нативной, т. е. стать более активным. Эта активация может частично компенсировать замедление реакции в соответствии с законом Аррениуса и проявляется в снижении экспериментально определяемой энергии активации.

Изучение кинетики пероксидазного окисления ферроцианида калия в замороженных растворах показало, что при температурах на 10–15 К ниже точки плавления чистого растворителя — воды осуществляется реакция, катализируемая не только растворимым, но и адсорбированным на поверхности фторопласта ферментом (рис. 4). Согласно работе [7], зависимость скорости реакции второго порядка от температуры замороженного раствора описывается выражением

$$v_0 = k[E]_0[S]_0(T_0 - T)/\Delta \sum_i c_i, \quad (1)$$

где $k = k^0 \cdot \exp(-E/RT)$ — константа скорости реакции, E — энергия активации в жидкой фазе, T_0 — температура плавления чистого растворителя, T — температура опыта, $[E]_0$ и $[S]_0$ — начальные концентрации в незамороженном растворе фермента и субстрата соответственно, $\sum_i c_i$ — сум-

ма концентраций всех растворенных веществ, а Δ — криоскопическая постоянная растворителя. Расчет показывает, что уменьшение энергии активации с 52,3 до 29,3 кДж/моль должно сдвинуть температуру максимума скорости реакции во льду с 262 до 252 К, т. е. в низкотемпературную область. Из рис. 4, однако, видно, что график температурной зависимости приведенной скорости реакции, катализируемой иммобилизованным ферментом, проходит через максимум при 268 К, т. е. сдвинут по сравнению с соответствующим графиком для свободного фермента в область высоких температур на 5 К.

Расхождения экспериментальных и предсказываемых моделью результатов не ограничиваются направлением сдвига температуры максимума

при уменьшении энергии активации в жидкой фазе. Экстраполяция графиков температурных зависимостей приведенных скоростей перекисидазного окисления в жидкой фазе (рис. 3) в область температур ниже 273К показывает, что реакция, катализируемая свободным ферментом, должна при 263К иметь приведенную скорость, равную $1,33 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. В замороженных растворах при этой температуре приведенная скорость равна $9,66 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, т. е. в 7,3 раза больше рассчитанной. Для перекисидазы, адсорбированной на поверхности фторопласта, наблюдается противоположная картина: рассчитанное для 268К значение приведенной скорости ($2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) оказывается в ~ 7 раз больше наблюдаемого в эксперименте ($0,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$). Причины «аномального» сдвига температурной зависимости и торможения реакции, катализируемой адсорбированным ферментом в замороженных растворах, следует, на наш взгляд, искать во влиянии поверхности адсорбента — фторопласта — на находящийся в непосредственной близости от нее слой раствора, т. е. на зону протекания реакции. По нашему мнению, основной вклад в замедление реакции при замораживании вносят ограничения скорости, связанные с диффузией, — явление, типичное для реакций, катализируемых в жидкой фазе иммобилизованными ферментами [16].

В стационарных условиях скорость реакции, контролируемой диффузией, пропорциональна величине диффузионного потока субстрата (J_s) к поверхности носителя с адсорбированным на ней ферментом:

$$J_s = D_s \frac{d[S]}{dy}, \quad (2)$$

где D_s — коэффициент диффузии субстрата, а $d[S]/dy$ — градиент его концентрации. Для описания физической картины осуществления в замороженном растворе реакции, контролируемой диффузией субстрата к поверхности с нанесенным на нее катализатором, будем считать, что замороженная суспензия представляет собой гетерогенную систему, состоящую в первом приближении из матрицы замерзшего растворителя (в нашем случае воды) и областей, где концентрируются растворенные вещества. При этом жидкий раствор в этих областях приближенно считаем идеальным. Если при замораживании по мере понижения температуры (T) градиент концентрации субстрата ($d[S]/dy$) увеличивается прямо пропорционально его растущей объемной концентрации, то будет справедливо следующее выражение для экспериментально определяемой скорости реакции (v) при температуре T :

$$v = D_s (T) \cdot \frac{d[S]}{dy} \cdot \frac{(T_0 - T)}{\Delta \sum_i c_i} \cdot \frac{S}{V_0}, \quad (3)$$

где V_0 — объем жидкой фазы незамороженной суспензии, а S — площадь, через которую осуществляется массоперенос субстрата, превращающегося в продукт при участии адсорбированного на носителе катализатора. Множитель $(T_0 - T)/\Delta \sum_i c_i$, как и в уравнении (1), показывает, во сколько

раз в условиях полного концентрирования возрастает объемная концентрация растворенных веществ при замораживании раствора [7]. Отсутствие перемешивания и уменьшение коэффициентов диффузии молекул, находящихся в непосредственной близости от поверхности твердых тел при температурах ниже 273К [17], является, по нашему мнению, причиной замедления диффузионного потока, а следовательно, и скорости реакции при замораживании. Дифференцируя выражение (3) по температуре, приравнявая производную нулю и решая полученное уравнение относительно T , получим выражение для температуры T^* , при которой скорость реакции в замороженной суспензии максимальна:

$$T^* = \sqrt{\frac{E^2}{4R^2} + \frac{ET_0}{R}} - \frac{E}{2R}. \quad (4)$$

По форме это выражение совпадает с приведенным в работе [7], однако вместо энергии активации реакции в жидкой фазе в него входит энергия активации диффузии в приповерхностном слое раствора. Таким образом, форма температурной зависимости приведенной скорости реакции, контролируемой диффузией, в замороженных растворах (см. ур-ние (3)) и положение максимума на графике соответствующей зависимости будут в простейшем случае определяться одновременным и противоположно направленным действием двух факторов. При понижении температуры, с одной стороны, происходит увеличение градиента концентрации субстратов вследствие их концентрирования в незамерзающих областях, что должно увеличивать диффузионный поток, а следовательно, и скорость реакции, с другой — увеличение вязкости снижает коэффициент диффузии и, следовательно, замедляет реакцию. Заметное уменьшение коэффициентов диффузии и увеличение ее энергии активации может быть вызвано перестройкой структуры приповерхностного слоя жидкости [17].

Результаты настоящей, а также опубликованных ранее работ показывают, что в замороженных растворах могут осуществляться реакции, катализируемые не только свободной [9] и ковалентно связанной [10], но и адсорбированной на поверхности твердого тела пероксидазой. Характерно, что независимо от того, определяется ли скорость реакции ее самой медленной химической стадией (кинетический режим) или скоростью диффузии реагентов (диффузионный режим), графики температурной зависимости скорости в замороженных растворах имеют колоколообразную форму.

Полученные результаты позволяют сделать некоторые выводы, общие для всех реакций в замороженных растворах и важные для понимания природы процессов, происходящих в подвергаемых криоконсервации биообъектах. На наш взгляд, можно утверждать, что локализация (в частности, адсорбция) на поверхности раздела фаз одного из реагентов или катализатора может вызвать лишь торможение реакции при замораживании, если сама поверхность не обладает свойствами катализатора. Поэтому процессы, для которых было обнаружено ускорение [7], вероятнее всего, протекают в объеме раствора, сосуществующего с твердой фазой замерзшего растворителя, т. е. и в замороженных растворах являются гомогенными реакциями. С этой точки зрения обнаружение аномально высокой ферментативной активности в подвергаемых криоконсервации биообъектах может в ряде случаев указывать на происходящие в них криповреждения, заключающиеся, в частности в разрушении биологических структур (например, мембран), сопровождающемся активацией локализованных в них ферментов.

Экспериментальная часть

В работе использовали пероксидазу КФ (1.11.1.7) из хрена (Reanal, ВНР) без дополнительной очистки; ферроцианид калия, перекристаллизованный из водного раствора; неорганические вещества марки х. ч. или ос. ч., фторопласт — отечественного производства. Исходный водный раствор пероксидазы центрифугировали 20–30 мин при 5000 об./мин для удаления нерастворившихся примесей. Концентрацию раствора пероксидазы определяли спектрофотометрически по поглощению при 403 нм ($\epsilon_{403} 9,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [18]). Рабочие растворы пероксидазы готовили разбавлением исходного раствора до нужной концентрации. Водные растворы перекиси водорода готовили разбавлением 30%-ного раствора. Концентрацию растворов H_2O_2 определяли спектрофотометрически ($\epsilon_{230} 72,1 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [19]). Для приготовления буферных растворов в ячейке предварительно откалиброванного по стандартным буферным растворам рН-метра «рН-121» смешивали растворы солей KH_2PO_4 и Na_2HPO_4 . Для приготовления растворов с $\text{pH} < 4$ раствор KH_2PO_4 подкисляли до требуемого значения рН концентрированной HCl ; растворы с $\text{pH} > 8$ готовили, подщелачивая раствор Na_2HPO_4 концентрированным NaOH . Для приготовления всех растворов использовали деионизованную, дважды перегнанную воду.

Иммобилизация пероксидазы на поверхности фторопласта. Для получения водной суспензии порошок фторопласта-4 с удельной поверхностью, определенной по низкотемпературной адсорбции азота, равной $1,25 \text{ м}^2/\text{г}$, обрабатывали по методике [20]. К 50 мл водной суспензии фторопласта, содержащей $\sim 3,4 \text{ г}$ сухого порошка, добавляли 10 мл $6\text{--}6,5 \text{ мкМ}$ водного раствора пероксидазы и 25 мл воды и перемешивали 20 мин на магнитной мешалке при комнатной температуре. Осадок фторопласта промывали декантацией дистиллированной водой до тех пор, пока промывные воды не переставали проявлять пероксидазную активность в окислении $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ перекисью водорода. Было показано, что пренебрежимо малая активность надосадочной жидкости не изменяется за время использования суспензии, что указывает на практически необратимый характер адсорбции.

Количество фермента, адсорбированное на поверхности фторопласта, определяли как разность между количеством пероксидазы, введенным в суспензию при иммобилизации и оставшимся в объединенных промывных водах. В условиях опыта 1 г фторопласта адсорбировал $2,8 \cdot 10^{-9} \text{ г-моль}$ пероксидазы. Концентрацию фермента в промывных водах определяли, зная зависимость скорости пероксидазного окисления $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ от концентрации фермента.

Для точного расчета разбавления растворов реагентов при приготовлении реакционной смеси было найдено соотношение объемов твердой фазы и раствора в водной суспензии фторопласта. При этом исходили из предположения, что ферро- и феррицианид-ионы не адсорбируются на неполярной, нейтральной поверхности фторопласта. С учетом сделанного предположения количество воды в аликвоте суспензии (10 мл) определяли следующим образом. К аликвоте суспензии добавляли 5 мл раствора $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ известной концентрации и, следовательно, известного оптического поглощения. Разбавление раствора имеющейся в суспензии водой приводило к уменьшению его оптического поглощения. По отношению начального и конечного значений поглощения рассчитывали количество воды в 10 мл суспензии. Оно оказалось равным 6,85 мл.

Анализ реакционной смеси. За кинетикой окисления $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ следили спектрофотометрическим методом, измеряя увеличение поглощения при 420 нм, связанное с накоплением продукта реакции $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$; $\epsilon_{420} 1,05 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [21]. При температурах выше 273К реакцию, катализируемую свободным ферментом, проводили непосредственно в термостатируемой с точностью $\pm 0,1\text{К}$ кювете регистрирующего спектрофотометра Aminco DW-2 (США). При работе с иммобилизованным ферментом реакцию проводили в термостатируемой ячейке, где реакционная смесь (35 мл) равномерно перемешивалась магнитной мешалкой. Скорость перемешивания выбирали такой, чтобы дальнейшее ее увеличение не влияло на скорость реакции. За кинетикой реакции в этом случае следили по методике, аналогичной [22], методом отбора проб. Пробы объемом 1,5 мл отбирали через каждые 1,5 мин шприцем через стеклянный фильтр. После измерения поглощения пробу возвращали в реакционный сосуд. Поскольку объем пробы составлял $\sim 4,5\%$ объема реакционной смеси, изменением концентраций компонентов при отборе и возвращении проб пренебрегали. Поглощение отобранных через стеклянный фильтр проб не изменялось со временем, что указывает на отсутствие в условиях эксперимента реакции в объеме надосадочной жидкости.

Методика проведения реакции в замороженных растворах аналогична описанной ранее [9].

Во всех случаях за реакцией следили вплоть до $\sim 30\%$ превращения. Из начальных скоростей, определенных по тангенсам углов наклона касательных к участкам кинетических кривых, соответствующим 4–6% превращения, рассчитывали значения приведенных скоростей реакции: $v_{\text{пр}} = v_0 / [\text{пероксидаза}] \cdot [\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6]_0$. Предварительно было показано, что в условиях эксперимента наблюдаемая начальная скорость реакции (v_0) пропорциональна концентрации фермента и субстрата. При обработке кинетических данных, полученных в опытах с иммобилизованным фермен-

том, его концентрацию относили по всему объему образца V_0 :

$$[\text{пероксидаза}]_{\text{им}} = \frac{E_{\text{адс}}}{V_{\text{сусп}}} \cdot \frac{V_1}{V_0},$$

где $V_{\text{сусп}}$ — объем исходной суспензии фторопласта, на поверхности которого адсорбировано $E_{\text{адс}}$ моль пероксидазы; V_1 — аликвота исходной суспензии фторопласта с нанесенным ферментом, вносимая в реакционную смесь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Курзаев А. Б., Келивидзе В. И., Киселев В. Ф. В сб.: Связанная вода в дисперсных системах, вып. 4. М.: Изд-во МГУ, 1977, с. 156–166.
2. Ушаков Л. А., Келивидзе В. И., Склякин А. А. В сб.: Связанная вода в дисперсных системах, вып. 1. М.: Изд-во МГУ, 1970, с. 155–165.
3. Келивидзе В. И., Курзаев А. Б. Докл. АН СССР, 1973, т. 208, № 2, с. 391–393.
4. Келивидзе В. И., Киселев В. Ф. Ж. структ. химии, 1967, т. 8, № 2, с. 221–226.
5. Юрнич Н., Мацура С., Среич Р., Джорджевич Л., Вучелич Д. Биофизика, 1980, т. 25, № 6, с. 1011–1016.
6. Баградзе Н. Г., Моисураишвили К. М., Кешелашвили Л. В. Биофизика, 1980, т. 25, № 1, с. 54–58.
7. Сергеев Г. Б., Батюк В. А. Успехи химии, 1976, т. 45, № 5, с. 793–826.
8. Alburn H. E., Grant N. H. J. Amer. Chem. Soc., 1965, v. 87, № 18, p. 4174–4177.
9. Сергеев Г. Б., Батюк В. А., Сергеев Б. М., Люкманов Н. Ф. Вестн. Моск. ун-та, сер. 2, химия, 1975, т. 16, № 5, с. 557–562.
10. Сергеев Г. Б., Гудима А. И., Сергеев Б. М., Таран А. А., Батюк В. А. Биохимия, 1981, т. 46, № 6, с. 986–989.
11. Hasinoff B. B., Dunford H. B. Biochemistry, 1970, v. 9, № 25, p. 4930–4938.
12. Генкин Н. В. Биофизика, 1978, т. 23, № 1, с. 155–156.
13. Митрофанова А. Н., Микельсоне З. В., Полторац О. М., Арен А. К. Вестн. Моск. ун-та, сер. 2, химия, 1979, т. 20, № 2, с. 114–117.
14. Козлов Л. В. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1243–1254.
15. Nemethy G., Scheraga H. A. J. Chem. Phys., 1962, v. 36, № 12, p. 3401–3417.
16. Lee S. B., Ryu D. D. Y. J. Theor. Biol., 1980, v. 84, p. 259–279.
17. Анисимов А. В., Даутова Н. Р. Биофизика, 1979, т. 24, № 6, с. 985–989.
18. Keilin D., Hartree E. E. Biochem. J., 1951, v. 49, p. 88–104.
19. George P. Biochem. J., 1953, v. 54, p. 267–276.
20. Яминский В. В. Взаимодействие неполярных твердых частиц в средах различной полярности. Автореф. дис. канд. хим. наук. М.: МГУ, 1966.
21. Critchlow J. E., Dunford H. B. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 12, p. 3714–3725.
22. Widiner F., Dixon J. E., Kaplan N. O. Anal. Biochem., 1973, v. 55, p. 282–287.

Поступила в редакцию
30.IV.1982

IMMOBILIZATION OF HORSE RADISH PEROXIDASE ON TEFLON SURFACE. COOLING AND FREEZING EFFECTS ON THE KINETICS OF ENZYMATIC OXYDATION

SERGEEV G. B., SERGEEV B. M., KONSTANTINOVA N. R., BATYUK V. A.

M. V. Lomonosov State University, Moscow

The kinetics of horseradish peroxidase catalyzed oxidation of potassium ferrocyanide have been studied in the temperature range of 313–253 K. The enzyme adsorption on the teflon surface leads to a dramatic inactivation and reduces the activation energy of the oxidation in the liquid phase from 52,3 to 29,3 kJ/mol. These effects are probably due to some structural changes in the enzyme molecule. In frozen solutions, bell-shaped temperature dependences of the reaction rate reach maximum at 263 and 268 K for soluble and adsorbed peroxidases, respectively. The temperature dependence shift and reduction of the oxidation rate in ice for the adsorbed enzyme are probably due to diffusional restrictions imposed by freezing.