

СОВМЕСТНАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ И ПЕРОКСИДАЗЫ НА ПОРИСТЫХ МЕМБРАННЫХ НОСИТЕЛЯХ

Е.В.ЛУКАШЕВА¹, М.Ю.РУБЦОВА², Г.В.КОВБА², Т.Т.БЕРЕЗОВ¹, А.М.ЕГОРОВ²

1 - Кафедра биохимии Российского университета дружбы народов, 117198 Москва, ул.Миклухо-Маклая, д.8 Факс 433-27-64

2 - Кафедра энзимологии химического факультета Московского государственного университета им.М.В.Ломоносова, 119899 Москва.

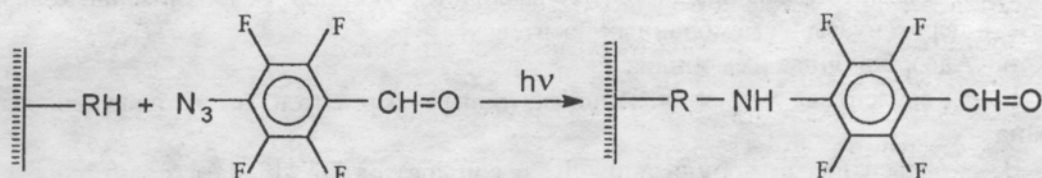
Работа имела целью разработку оптимальных методов совместной иммобилизации L-лизин- α -оксидазы из *Trichoderma sp.* и пероксидазы из хрена. В качестве носителей были использованы мембраны нитроцеллюлозы, нейлона и положительно заряженного нейлона промышленного производства. Иммобилизацию осуществляли либо методом адсорбции, либо методом ковалентного связывания на содержащих альдегидные группы мембранах. Для внедрения альдегидных групп в мембраны их предварительно облучали ультрафиолетовым светом в присутствии п-азидотетрафторбензальдегида. Подобраны оптимальные условия иммобилизации, концентрации п-азидотетрафторбензальдегида и ферментов. Изучены возможности использования мембран с совместно иммобилизованными L-лизин- α -оксидазой и пероксидазой для определения концентраций L-лизина в растворе.

Ключевые слова: иммобилизация ферментов, пероксидаза, L-лизин- α -оксидаза, определение L-лизина, инструментальный анализ.

ВВЕДЕНИЕ. Аминокислота L-лизин наделена рядом уникальных функций в организме; в частности, она является основным компонентом при синтезе гистонов. Организмы человека и животных лишены способности синтезировать эту аминокислоту. Поэтому L-лизин часто используют в качестве добавок к пище для обеспечения сбалансированного питания [1,2]. В клинической практике важной задачей является использование L-лизина в смеси с другими аминокислотами для обеспечения сбалансированного парентерального белкового питания при некоторых патологических состояниях. У животных добавление L-лизина в корма значительно увеличивает скорость их роста, плодовитость и продуктивность [3]. Существует ряд методов определения концентрации L-лизина, в число которых входят и энзиматические методы; к последним относится метод с использованием сахарофиндегидрогеназы и L-лизин- α -кетоглутаратдегидрогеназы [4,5]. Для определения концентрации L-лизина в наших работах мы использовали L-лизин- α -оксидазу (ЛО) из гриба *Trichoderma sp.*, преимуществом которого является высокая избирательность и низкая K_m по отношению к L-лицину, а также хорошая стабильность при хранении [6,7]. В настоящее время все большее распространение получают не требующие использования каких-либо специальных приборов экспресс-методы определения концентраций веществ. Например, широко используются полоски (мембраны) для определения концентрации глюкозы с помощью совместно иммобилизованных глюкозооксидазы и пероксидазы. Целью настоящей работы была разработка методов иммобилизации ЛО совместно с пероксидазой из хрена (ПХ) на различных носителях мембранного типа и создание условий для количественного определения концентрации L-лизина с использованием этих мембран.

МЕТОДИКА L-лизин- α -оксидазу получали из культуральной жидкости гриба *Trichoderma sp.* по методу [8]. В работе использовали пероксидазу из хрена R_z 3.0 (Diozyme Laboratories Ltd., UK), пористые мембраны: Hybond ECL (нитроцеллюлоза), Hybond N (наилон), Hybond N⁺ (N⁺ найлон - положительно заряженный найлон) (Amersham Intl. plc, UK). п-Азидотетрафторбензальдегид (п-АТФБА) синтезирован на кафедре химической энзимологии МГУ по методу [9]. Измерение оптической плотности мембран осуществляли на отражательном денситометре Shimadzu CS-9000 (Japan), а растворов - на спектрофотометре Beckman - DU 8B (USA).

Иммобилизация ЛО и ПХ. Для выбора оптимального носителя сначала проводили раздельную иммобилизацию двух ферментов на пористых мембранах трех типов: нитроцеллюлоза, найлон и N⁺ найлон. Все эксперименты по иммобилизации проводили при комнатной температуре и перемешивании на качалке. Растворы нативных ЛО и ПХ, конъюгатов ПХ с бычьим сывороточным альбумином (ПХ^сБСА) и с иммуноглобулином (ПХ^сИГ) готовили в 0,1 М трис-HCl буфере pH 8,0. Отмывание несвязавшегося с мембранами белка проводили тем же буфером с добавлением 0,1% (об) Tween 20. Для иммобилизации ферментов использовали метод адсорбции и метод ковалентной иммобилизации на фотоактивированных мембранах (рис.1). В первом методе кусочки мембран инкубировали в растворе ПХ с концентрацией 0,05 - 1,0 мкМ или в растворе ЛО с концентрацией 0,03 - 0,75 мкМ. При совместной иммобилизации инкубационный раствор содержал оба фермента. Для ковалентной иммобилизации ферментов мембраны предварительно обрабатывали раствором п-АТФБА (25 мг/мл в ацетоне), высушивали в темном месте и облучали бытовой ультрафиолетовой лампой в течение 10 минут на расстоянии 9 см, затем отмывали два раза ацетоном, затем дистиллированной водой, затем 0,01 М карбонатным буфером pH 9,5. В результате этой операции на поверхности мембран появлялись свободные альдегидные группы, способные ковалентно связываться с аминогруппами ферментов:



Ковалентную иммобилизацию нативных ПХ и ЛО на фотоактивированных мембранах осуществляли инкубацией последних либо в растворе ПХ (0,05 - 1,0 мкМ) либо в растворе ЛО (0,03 - 0,75 мкМ). При совместной иммобилизации ЛО и ПХ мембраны инкубировали в растворе, содержащем оба фермента в тех же интервалах концентраций.

Ковалентную иммобилизацию на фотоактивированных мембранах использовали для связывания не только нативной ПХ, но и конъюгатов этого фермента с ИГ (рис.1), используя для связывания концентрации конъюгатов 0,05 - 1,0 мкМ. Проводили также совместную иммобилизацию конъюгатов ПХ и нативной ЛО. Конъюгаты ПХ с ИГ получали по методу [10].

Определение активности иммобилизованной ПХ осуществляли, помещая кусочек мембраны определенной площади в 1,0 мМ раствор [2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолон 6-сульфоновая кислота) диаммониевая соль] (АБТС) в 0,1 М цитрат-фосфатном буфере pH 5,6, содержащем 2,0 мМ перекись водорода. Концентрацию продукта окисления АБТС присутствии ПХ определяли по оптическому поглощению раствора при длине волны 414 нм,

используя значение коэффициента молярной экстинкции $\epsilon_{414} = 31000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [11]. Удельную поверхностную активность иммобилизованных ферментов определяли как количество мкмоль продукта окисления АБТС, образующегося за 1 мин при использовании образца мембран с иммобилизованным ферментом площадью 1 cm^2 .

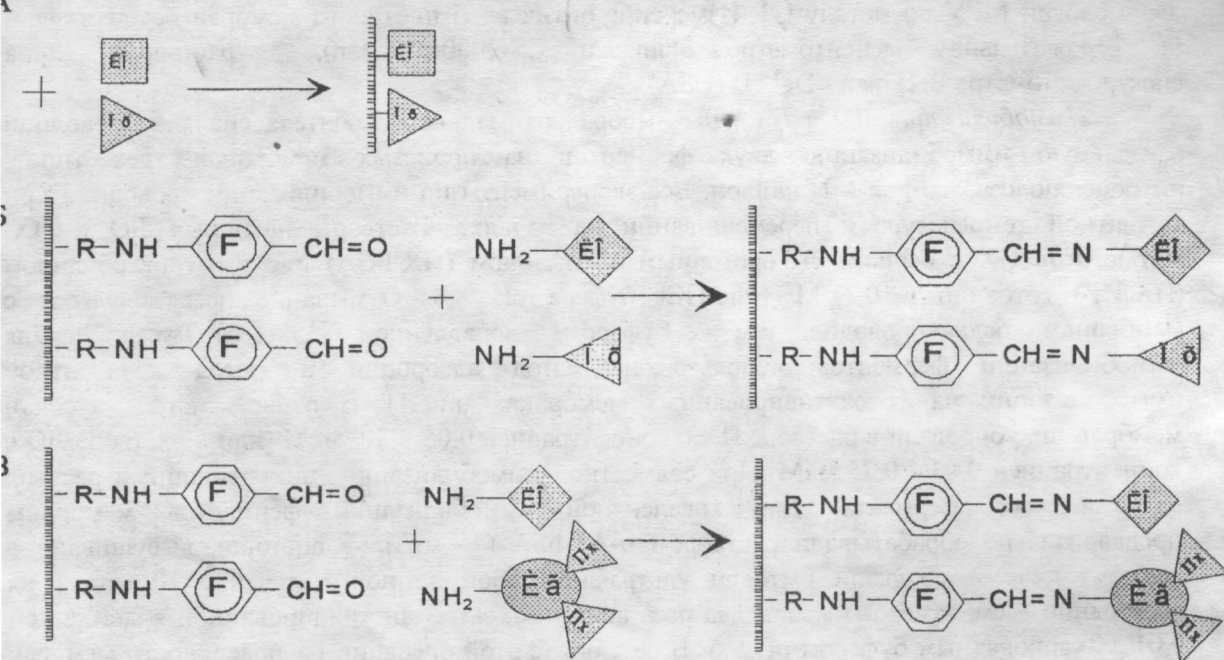


Рис. 1. Схематическое представление различных методов иммобилизации L-лизин- α -сидазы и пероксидазы на мембранных носителях.

- А - Адсорбционная иммобилизация
- Б - Ковалентная иммобилизация нативных ферментов на фотоактивированных мембранах
- В - Ковалентная иммобилизация ЛО и конъюгатов ПХИГ на фотоактивированных мембранах

Определение активности иммобилизованной на мембранах ЛО осуществляли, помещая образцы мембран площадью 1 cm^2 в $1,0 \text{ mM}$ раствор L-лизина, содержащий $1,0 \text{ nM}$ КХ и $1,0 \text{ mM}$ АБТС в том же буфере.

При определении активности совместно иммобилизованных ЛО и ПХ помещали образцы мембран той же площади в $1,0 \text{ mM}$ раствор L-лизина в том же буфере, содержащий $1,0 \text{ mM}$ АБТС.

Определение концентрации Лизина. Определение концентрации L-лизина с использованием АБТС осуществляли, инкубируя при покачивании квадратики нейлоновых мембран с иммобилизованными ЛО и ПХ размером 1 cm^2 в $3,0 \text{ мл}$ $1,0 \text{ M}$ трис-фосфатного буфера pH 5,6, содержащего $1,0 \text{ mM}$ АБТС и различные концентрации лизина. Измеряя оптическую плотность раствора при 414 нм , определяли количество образующегося продукта окисления АБТС. Затем построили график зависимости оптической плотности при 414 нм , замеренной через 20 мин после начала реакции, от исходной

концентрации L-лизина. Этот график может использоваться как калибровочная кривая для определения исходной концентрации лизина (рис.4).

Определение концентрации L-лизина с использованием о-дианизидина осуществляли, инкубируя в течение 15 мин предварительно обработанные додецилсульфатом натрия квадратики N^+ наилоновых мембран с иммобилизованными ЛО и ПХ размером 1 см^2 в 3,0 мл 1,0 М цитрат-фосфатного буфера рН 5,6, содержащего 1,0 мМ о-дианизидин и различные концентрации L-лизина. Затем мембраны вынимали из раствора, высушивали и определяли их оптическую плотность на отражательном денситометре при длине волны 380 нм. График зависимости интенсивности окрашивания мембран от исходной концентрации L-лизина может быть использован как калибровочная кривая для определения концентрации L-лизина в растворе (рис.4).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Иммобилизованный фермент представляет собой систему, действие которой определяется правильным подбором трех компонентов: фермента, носителя и способа связывания фермента с носителем. Для иммобилизации ферментов используется огромное число носителей органического и неорганического происхождения. Вводя различные функциональные группы можно широко варьировать физические свойства носителей и создаваемое ими микроокружение для иммобилизованных молекул фермента. При совместной иммобилизации двух ферментов поиск оптимального носителя и метода иммобилизации значительно усложняются. Для опытов по иммобилизации ЛО и ПХ мы выбрали промышленные мембранные носители, так как они обладают рядом преимуществ: большой удельной поверхностью и, соответственно, большой емкостью по белку, а также высокой механической прочностью. Промышленные мембранные носители стандартизованы по составу, размеру и количеству пор, что особенно важно для оптимизации метода. Мембранные носители, в отличие от носителей в виде гранул, очень удобны для пользователя, так как их можно применять для проведения анализов, погружая в раствор наподобие индикаторных бумажек. В данной работе мы использовали различные типы мембран фирмы "Amersham": нейлон, положительно заряженный нейлон и нитроцеллюлозу. Для сравнительного изучения процесса иммобилизации ферментов нами была выбрана поверхностная удельная активность, которую выражали в нмолях продукта, образующегося за 1 мин на 1 см^2 иммобилизованного фермента. Следует отметить, что определяемая величина не отражает общего количества иммобилизованного фермента, а характеризует ферментативную активность, приходящуюся на единицу площади носителя. Предварительные эксперименты проводили с каждым из ферментов в отдельности.

Иммобилизацию ПХ проводили двумя методами: методом физической адсорбции и методом ковалентной иммобилизации (рис.1). Оптимальные условия для иммобилизации первым методом определяли на основании кривых адсорбции и выбирали начальную концентрацию ПХ, при которой кривая адсорбции выходит на насыщение, а дальнейшее увеличение концентрации ПХ в растворе не приводит к возрастанию количества иммобилизованного вещества. В табл.1 представлены данные об удельной поверхностной концентрации ПХ, иммобилизованной на трех типах носителей в оптимальных условиях иммобилизации. Их анализ показывает, что все носители характеризуются достаточно низкой величиной удельной поверхностной активности фермента. Из трех типов носителей наибольшей величиной активности ПХ на единицу площади носителя характеризовалась нитроцеллюлоза.

Для ковалентной иммобилизации ПХ использовали модифицированные матрицы, полученные фотоактивированием мембран п-АТФБА (рис.1). Оптимальную концентрацию бифункционального реагента и оптимальную начальную концентрацию ПХ для связывания с носителем выбирали по величине удельной поверхностной активности иммобилизованного

фермента. В табл. 1 приведены данные по определению удельной поверхностной активности ПХ, иммобилизованной методом ковалентной иммобилизации. При использовании этого подхода удалось лишь незначительно увеличить удельную активность иммобилизованной пероксидазы. По-видимому, это связано с тем, что для связывания использовали аминокислотные группы ПХ, модификация которых, как известно, может существенно влиять на каталитическую активность. Поскольку нитроцеллюлоза не может быть обработана

Таблица 1. Удельная поверхностная активность пероксидазы из хрена, иммобилизованной на различных носителях методами адсорбции и ковалентной иммобилизации

Фермент	Способ иммобилизации	Начальная концентрация фермента в растворе, мкМ	Тип мембраны	Удельная пов. активность ПХ мкмоль, мин ⁻¹ см ⁻²
пероксидаза	адсорбция	0,3	нитроцеллюлоза	5,0
			нейлон	1,0
			N ⁺ - нейлон	1,2
пероксидаза	ковалентная иммобилизация на фото-активир. мембранах	0,15	нитроцеллюлоза	-
			нейлон	1,2
			N ⁺ - нейлон	3,7
конъюгат ПХБСА	адсорбция	0,3	нитроцеллюлоза	16,0
			нейлон	11,0
			N ⁺ - нейлон	15,0
конъюгат ПХИП	адсорбция	0,3	нитроцеллюлоза	18,0
			нейлон	10,0
			N ⁺ - нейлон	15,0

органическими растворителями, этот носитель не использовали для ковалентной иммобилизации. Полученные результаты по иммобилизации ПХ как методом адсорбции, так и методом ковалентной иммобилизации свидетельствуют о том, что иммобилизация ПХ непосредственно на поверхности мембранного носителя не позволяет получить препарат иммобилизованного фермента с характеристиками, необходимыми для разработки высокочувствительного аналитического устройства.

Из литературы было известно, что максимальная концентрация активной ПХ на носителе меньше, чем в случае по иммобилизации с использованием сывороточного альбумина и иммуноглобулинов [12]. С целью свести к минимуму контакт ПХ с мембраной (и тем самым сохранить ее активность) и увеличить количество иммобилизованных молекул ПХ на единицу площади было решено использовать для иммобилизации конъюгаты ПХ с БСА и неспецифическими иммуноглобулинами. Конъюгаты были получены стандартным способом окислением углеводной части молекулы ПХ периодатом натрия. Действительно оказалось, что использование инертных белков позволяет увеличить активность иммобилизованного фермента (табл. 1).

Опыты по иммобилизации ЛО методом адсорбции показали, что максимальное количество ЛО связывается с N⁺ нейлоновой мембраной при концентрации ЛО в растворе 0,38 мкМ. Иммобилизация ЛО ковалентным связыванием с фотоактивированными

мембранами не приводила к значительному увеличению удельной поверхностной активности (Табл.2). Дальнейшие эксперименты по совместной иммобилизации ЛО и ПХ мы продолжили с мембранами N⁺ нейлона, так как кроме хорошей адсорбционной способности по отношению к L-лизину они отличаются хорошей механической прочностью в отличие от ломких нитроцеллюлозных мембран и могут быть использованы для ковалентной иммобилизации.

Табл.2. Удельная поверхностная активность L-лизин- α -оксидазы, иммобилизованной на различных мембранах методом адсорбции и методом ковалентного связывания. Начальная концентрация фермента 0,38 мкМ.

Тип мембраны	Тип иммобилизации	Удельн.пов. активность, нмоль·мин ⁻¹ ·см ⁻²
Нитроцеллюлоза	Адсорбция	1,6
Нейлон	- // -	0,4
N ⁺ Нейлон	- // -	8,0
N ⁺ Нейлон	Ковалентная	8,4

Табл.3. Влияние концентрации п-азидотетрафторбензальдегида на совместную иммобилизацию L-лизин- α -оксидазы и пероксидазы на различных мембранах. Начальная концентрация L-лизин- α -оксидазы в растворе 0,75 мкМ.

Тип мембраны	Конц.п-АТФБА, мг/мл	Начальная конц.ПХ в растворе, нмоль/мл	Удельн.пов. активность, нмоль·мин ⁻¹ ·см ⁻²
нейлон	2	30	4.0
нейлон	10	30	2.7
N ⁺ нейлон	2	30	28.8
N ⁺ нейлон	10	30	24.1
нейлон	2	300	13.4
нейлон	10	300	9.4
N ⁺ нейлон	2	300	26.8
N ⁺ нейлон	10	300	22.1

Перед тем, как провести совместную ковалентную иммобилизацию ЛО и ПХ, была оптимизирована концентрация п-АТФБА для фотоактивации мембран. Было найдено, что при фотоактивации мембран (Табл. 3) раствором п-АТФБА с концентрацией 2 мг/мл удельная активность иммобилизованных ПХ и ПХИГ имеет максимальное значение.

При этом пероксидаза, иммобилизованная в конъюгированной форме, характеризовалась более высоким значением удельной активности по сравнению с иммобилизованной нативной пероксидазой. Увеличение концентрации п-АТФБА не приводило к увеличению удельной поверхностной активности иммобилизованного фермента.

Поскольку ковалентная иммобилизация конъюгатов ПХ позволяет получить мембраны значительно более высокой удельной поверхностной активностью, пероксидазу для совместной ковалентной иммобилизации с ЛО использовали в виде конъюгатов. Для подбора оптимальных для ковалентной иммобилизации концентраций ферментов сначала при фиксированной концентрации ПХ^xИГ варьировали концентрацию ЛО, используя концентрации 0,05; 0,09; 0,19; 0,38; 0,76 мкМ. Наибольшая удельная поверхностная активность мембран наблюдалась при концентрации ЛО) 0,38 мкМ. Затем при этой фиксированной концентрации ЛО проварьировали начальные концентрации конъюгата

Пх^хИГ (7, 15, 30, 60 нМ). Оптимальной оказалась концентрация конъюгата, равная 60 нМ, и в дальнейшем для получения мембран использовали именно эти оптимальные концентрации ЛО и конъюгата ПХ. Необходимо отметить, что совместная иммобилизация ЛО и ПХ позволяет получить мембраны с существенно более низкой удельной поверхностной активностью, чем при использовании конъюгированной ПХ для совместной ковалентной иммобилизации с ЛО (Табл..4).

Таблица 4. Удельная поверхностная активность совместно иммобилизованных L-лизин-α-оксидазы и пероксидазы на различных фотоактивированных мембранах. Концентрация п-АТФБА 2 мг/мл.

Тип мембраны	Начальная конц. ЛО, мкМ	Начальная конц. ПХ ^х ИГ, нМ	Удельн.пов. активность, мкмоль мин ⁻¹ см ⁻²
N ⁺ найлон	0,75	60	0,88
	0,38	--	1,2
	0,19	--	0,75
	0,09	--	0,63
	0,04	--	0,28
N ⁺ найлон	0,38	60	1,58
		30	1,34
		15	0,80
		7	0,72
N ⁺ найлон	0,75	ПХ 60	0,35·10 ⁻³

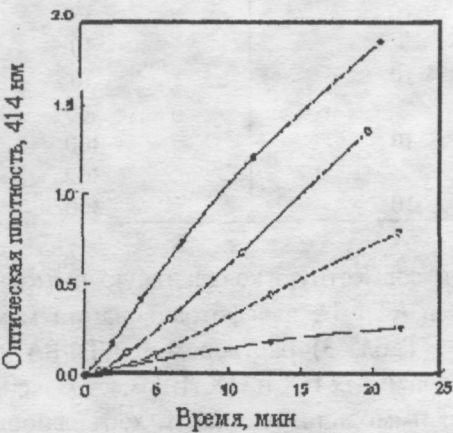


Рис.2. Влияние рН на окисление АБТС перекисью водорода, образующейся при окислительном дезаминировании L-лизина в присутствии совместно иммобилизованных на положительно заряженном нейлоне L-лизин-α-оксидазы и пероксидазы. Совместная иммобилизация нативной пероксидазы и L-лизин-α-оксидазы при их исходной концентрации 40 нМ и 0,38мкМ, соответственно. Концентрация п-АТФБА 2 мг/мл. Кинетические кривые детектированы в 100 мМ цитрат-фосфатном буфере при рН: ○ - 4,5; ● - 5,0; ▽ - 5,5; ▼ - 6,0.

Изучение влияния pH буфера, который используется для определения удельной поверхностной активности мембран с двумя ферментами, показало, что максимальная активность наблюдается при pH 5.0 (рис.2).

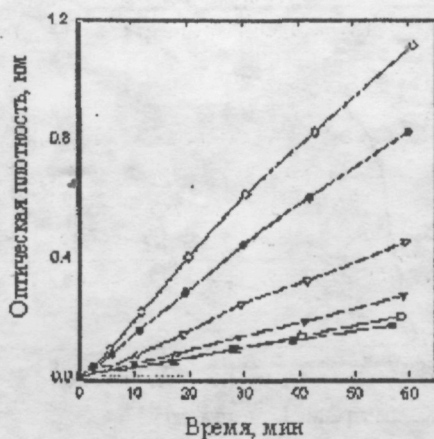


Рис.3. Кинетические кривые окисления АБТС перекисью водорода, образующейся при окислительном дезаминировании L-лизина в присутствии совместно иммобилизованных на положительно заряженном нейлоне L-лизин- α -оксидазы и пероксидазы, детектированные при различных исходных концентрациях L-лизина. Совместная иммобилизация нативной пероксидазы и L-лизин- α -оксидазы при их исходной концентрации 40 нМ и 0,38 мкМ, соответственно. Концентрация п-АТФБА 2 мг/мл. Исходные концентрации L-лизина: ○ - 1000 мкМ, ● - 300 мкМ, ▽ - 150 мкМ, ▼ - 50 мкМ, □ - 10 мкМ, ■ - 3 мкМ.

Определение L-лизина с помощью со-иммобилизованных ЛО и ПХ. Для детекции концентрации L-лизина с помощью со-иммобилизованных ЛО и ПХ были испробованы два метода.

Первый метод заключается в том, что мембрану с со-иммобилизованными ферментами погружают в буферный раствор, содержащий постоянную концентрацию АБТС и различные концентрации L-лизина. Реакция катализируемого ЛО окислительного дезаминирования L-лизина протекает с образованием перекиси водорода, накопление которой может быть определено путем измерения в растворе оптического поглощения продукта окисления АБТС, образующегося в присутствии ПХ и перекиси водорода. На рис.3 представлены кинетические кривые накопления в растворе окрашенного продукта окисления АБТС в зависимости от исходной концентрации L-лизина в растворе. Второй метод заключается в использовании о-дианизидина в качестве субстрата ПХ. Если поверхность мембран дополнительно обработать отрицательно заряженным декстрансульфатом натрия и поместить мембраны в раствор с постоянной концентрацией о-дианизидина и различными исходными концентрациями L-лизина, то интенсивно окрашенный в зеленый цвет нерастворимый продукт окисления о-дианизидина свяжется с поверхностью мембраны [13]. Зависимость от исходной концентрации L-лизина в растворе интенсивности окрашивания мембран после их выдерживания в течение 15 мин в растворе L-лизина и о-дианизидина, измеренная на денситометре, представлена на (рис.4.)

Минимальный предел определяемых концентраций L-лизина при использовании АБТС (время детекции 20 мин) составляет 120 мкМ, соответствующая величина при использовании о-дианизидина (время детекции 15 мин) составляет 50 мкМ. Увеличение

времени инкубации нежелательно, особенно в первом случае, так как при значительном повышении концентраций продукта окисления АБТС (поглощающего при 414 нм) в

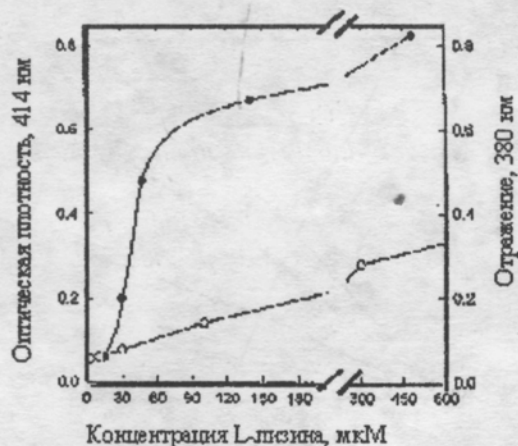


Рис.4. Стандартные кривые определения L-лизина с помощью совместно иммобилизованных на поверхности положительно заряженного нейлона L-лизин- α -оксидазы и пероксидазы (исходные концентрации для иммобилизации 0,38 мкМ и 40 нМ, соответственно).

○ - детекция в растворе с АБТС в качестве субстрата пероксидазы, время детекции 20 мин., ● - детекция на поверхности мембран с о-дианизидином в качестве субстрата пероксидазы, время детекции 15 мин.

растворе, этот продукт может подвергаться дальнейшим превращениям с образованием неокрашенных соединений. Во втором случае более длительная инкубация также нецелесообразна, так как продукты окисления о-дианизидина могут частично диффундировать в раствор.

С использованием о-дианизидина и мембран была получена шкала окрашивания мембран после 15-минутной инкубации в растворе L-лизина в зависимости от исходной концентрации последнего. Эта шкала и N^+ нейлоновые мембраны с со-иммобилизованными ПО и ПХ могут использоваться для быстрого неинструментального определения концентраций L-лизина в растворе.

Грантное финансирование: Госзаказ Министерства Науки и Технической политики РФ "Разработка базовой технологии для создания универсальных специфических реагентов на основе водонерастворимых носителей".

ЛИТЕРАТУРА

1. Millard D.J., Rivers J.P.W. // Eur.J.Clin.Nutr. - 1988. - vol.42, N5. - P.367-393.
2. Хадуев С.Х., Бerezov T.T. // Вопросы питания. - 1987. - №2. - с.8-11.
3. Олдхем Дж.Д. // Сб. "Новейшие достижения в исследовании питания животных" вып.2. - 1983. - М. - Колос. - с. 38-68.
4. Laber B., Amrhein N. // Anal. Biochem. - 1989. - Vol.181. - P.297-301.
5. Soda K., Hirasawa T., Fukumura T. // Anal. Biochem. - 1978. - Vol.87. - P.283-286.
6. Berezov T.T., Lukasheva E.V. // Biochem. - 1988. - Vol.17. - P.529-534.

7. *Lukasheva E.V., Dzhukovskii A.P., Berezov T.T.* // In: Modern Enzymology: Problems and Trends. (Eds. B.I.Kurganov, S.N.Kochetkov and V.I.Tishkov). - 1995. - Nova Science Publishers. - NY. - P.593-597.
8. *Лаугалене Н.Ф., Веса В.С., Янкиявичене Р.П., Пуоджюте С.П., Суджювене О.Ф., Песлякос И.И., Хадуев С.Х., Березов Т.Т.* // *Вопр.мед.химии.* 1990 - т.36. - №4. - с.88-90.
9. *Михалина Т.В.* // *Известия СО АН СССР.* - 1988. - №9. - с.92-95.
10. *Nakane P.K., Kanaoi A.* Peroxidase-labelled antibody // *J. Histochem. Cytochem.* - 1974. - Vol.22. - P.1084-1091.
11. *Smith A.T., Sanders S.A., Sampson C., Bray R.S., Burke F., Thonneley R.N.F.* // In: Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology (Ed. Welinder K.G.). - 1993. - Geneve Univ. - P.153-168.
12. *Добриков М.И., Тенетова Е.Д., Шишкин Г.В.* // *Биотехнология* - 1991. - N1. - с. 80-83.
13. *Yatsimirskaya E.A., Gavrilova E.M., Egorov A.M.* // *Anal. Biochemistry.* - 1993. - Vol.211. - P.274-278.

CO-IMMOBILIZATION OF L-LYSINE α -OXIDASE AND PEROXIDASE ON POROUS MEMBRANE CARRIERS.

E.V.LUKASHEVA¹, M.JU. RUBTSOVA², G.V.KOVBA², T.T.BEREZOV¹, A.M.EGOROV²

1 - Dpt. of Biochemistry, Russian Peoples' Friendship University, Mickluho-Maklaya st., 8, 117198, Moscow, Russia FAX 434-04-12

2 - Dpt. of Chemical Enzymology, Chemical Faculty, M.V.Lomonosov Moscow State University, 119899 Moscow, Russia

The goal of the present study was the development of the optimal method of co-immobilization of two enzymes: L-lysine α -oxidase from *Trichoderma sp.* and horseradish peroxidase. Commercial nitrocellulose, nylon and N⁺ nylon membranes were used as carriers. The immobilization was carried out either by absorption or by covalent binding with aldehyde groups. The aldehyde groups were attached to the surface of the carriers by UV-irradiation of membranes in the presence of p-azidotetrafluorobenzaldehyde. The optimal concentrations of reagents, enzymes and reaction conditions were found. The membranes with the co-immobilised L-lysine α -oxidase and peroxidase were shown to be useful for the determination of L-lysine concentrations.

Key-words: enzyme immobilization, peroxidase, L-lysine- α -oxidase, determination of L-lysine, membrane carriers.