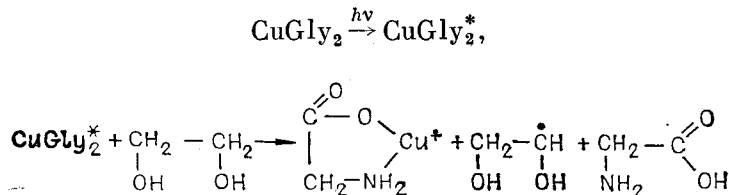


этих радикалов при фотоллизе  $\text{CuGly}_2$  в этиленгликоле происходит в результате отрыва атома водорода от многоатомного спирта фотовозбужденной молекулой комплекса. При этом двухвалентная медь в комплексе восстанавливается до одновалентной, и, видимо, образуется исходная аминокислота по схеме



Таким образом, фотохимическое превращение МКА без добавления многоатомных спиртов происходит путем внутримолекулярного переноса электрона с последующим распадом карбоксильного радикала. В присутствии многоатомных спиртов наблюдается межмолекулярное взаимодействие возбужденной молекулы комплекса и молекулы многоатомного спирта с отрывом атома водорода от молекулы спирта. Нам представляется вполне вероятным, что такое изменение механизма фотоллиза, наблюдаемое в модельных условиях, происходит и в реальных фотослоях. Возможность протекания реакции межмолекулярного переноса атома водорода при фотоллизе слоев, содержащих МКА, может быть использована для нового подхода к повышению ФЧ и спектральной сенсбилизации данных фотослоев.

Выражаем благодарность Н. М. Бажину за интерес, проявленный к этой работе, В. Ф. Плюснину и Н. П. Грицан за помощь в проведении эксперимента при низких температурах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ерошкин В. И., Шелковников В. В., Тронов А. Б., Дурасов В. Б. Термическое разложение медных комплексов аминокислот.— Журн. физ. химии, 1980, т. 54, № 10.
2. Шагисултанова Г. А., Илюкевич Л. А. О фотоллизе некоторых соединений меди.— Журн. неорг. химии, 1966, т. 11, № 4.
3. Умланд Ф., Янсен А., Тириг Д., Вюши Г. Комплексные соединения в аналитической химии.— М.: Мир, 1975.
4. Алфимов М. В. О современном состоянии и путях развития бессеребряной фотографии.— Черноголовка, 1981. (Препринт/АН СССР, Ин-т хим. физики).
5. Еремин Л. И. и др. Влияние добавок на усиление скрытого и видимого изображения в фотографических системах с химическим проявлением.— В кн.: Всесоюз. конф. по процессам усиления в фотографических системах регистрации информации. Минск: БГУ им. В. И. Ленина, 1981.
6. Макаров И. Е., Ершов Б. Г. Исследование методом ЭПР фотопревращений радикалов в многоатомных спиртах,  $\gamma$ -облученных при 77 К.— Изв. АН СССР, 1970, № 3.

Поступила в редакцию 30 марта 1983 г.

УДК 773.79 : 577.15.087.9

М. И. ДОБРИКОВ, Г. В. ШИШКИН  
(Новосибирск)

### ФОТОМАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ФОТОИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ. ЗАВИСИМОСТЬ СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОТ СПОСОБА ФОТОИММОБИЛИЗАЦИИ

Иммобилизация ферментов на полимерных носителях повышает стабильность ферментов и резко расширяет возможности практического использования их в биотехнологии. Среди способов ковалентной иммобилизации особый интерес представляют фотохимические методы, сущность

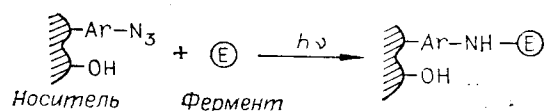
которых заключается в том, что ковалентная связь между ферментом и носителем образуется в результате фотохимической реакции. Достоинством этих методов является то, что фотоиммобилизацию можно проводить в мягких условиях практически с полным сохранением ферментативной активности [1], что открывает возможности использования уникальных каталитических свойств ферментов для изготовления высокочувствительных бессеребряных фотоматериалов. В общем случае для получения фотографического изображения на основе фотоиммобилизованных ферментов необходимо провести ковалентную фотоиммобилизацию фермента на листовом носителе, т. е. получить скрытое фотографическое изображение, закрепить его отмывкой ковалентно несвязанного фермента, усилить в ходе ферментативной реакции и перевести продукты ферментативной реакции в видимое изображение (проявить).

Фотоиммобилизация фермента — единственная светочувствительная стадия фотопроцесса, и она полностью определяет спектральную светочувствительность и в значительной степени общую светочувствительность фотоэнзимоматериала. Иммуобилизацию ферментов под действием света можно проводить четырьмя различными способами; некоторые из них описаны в обзоре [2].

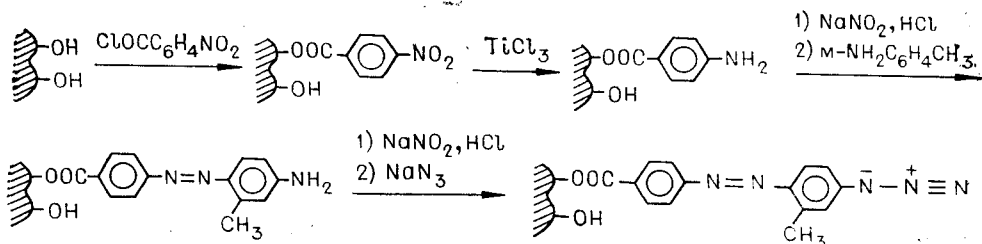
Целью настоящей работы являются сравнение всех четырех способов фотоиммобилизации ферментов и выявление влияния особенностей каждого из них на светочувствительность фотоматериалов.

Чтобы иметь возможность сопоставлять получаемые результаты, все четыре способа фотоиммобилизации ферментов проводили в сравнимых условиях, используя для этого довольно близкие по спектральным и фотохимическим свойствам ароматические азиды в качестве фотокомпонента, носители на основе целлюлозы, единую ферментативную систему усиления скрытого изображения — фосфомоноэстеразу (ФМЭ) в качестве фермента и  $\alpha$ -нафтилфосфат в качестве субстрата. Скрытое изображение проявлялось методом одновременного азосочетания продукта ферментативной реакции ( $\alpha$ -нафтола) со стабилизированной солью диазония (Синий прочный RR).

**Общее описание способов фотоиммобилизации ферментов.** 1. Фотоиммобилизация фермента на светочувствительном модифицированном носителе



заключается в том, что на светочувствительный полимерный носитель, изготовленный заранее, наносится раствор нативного фермента. При экспонировании под действием света за счет реакции с фотокомпонентой фермент ковалентно фотоиммобилизуется. После этого несвязавшийся фермент отмывают буферными растворами, содержащими поверхностно активные вещества. Скрытое изображение, состоящее из каталитически активного фотоиммобилизованного фермента, проявляют гистохимическими способами. В качестве светочувствительного носителя использовалась 4-(4'-азидо-2'-метилфенилазо)-бензоилцеллюлоза, которую получали по следующей схеме:

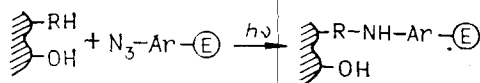


Хроматографическую бумагу ФН-11 ацилировали п-нитробензоилхлоридом, нитрогруппу в п-нитробензоилцеллюлозе восстанавливали трехвалентным титаном согласно [3]. После восстановления определяли степень модификации целлюлозы в мольных процентах, т. е. число п-аминобензоильных групп, приходящихся на 100 углеводных звеньев. Для этого п-аминобензоилцеллюлозу окрашивали раствором п-(N, N-диметиламино)-бензальдегида (реагента на первичные ароматические аминогруппы) [4] и плотность окраски сравнивали с калибровочной кривой, полу-

ченной на основе модельного красителя  $\text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}(\text{CH}_3)_2$

Аминогруппу диазотировали, образуя п-диазобензоилцеллюлозу сочетали с м-толуидином аналогично [5] с последующим диазотированием аминокрасителя и замещением диазогруппы на азидогруппу. Полноту протекания реакций контролировали денситометрически в отраженном свете на ФМ-58, используя способность аминокрасителя резко менять свой цвет при изменении pH и отсутствие такой способности у азидоазокрасителя. Для дальнейшей работы применяли светочувствительный носитель со степенью модификации 0,08—0,20 моль %. При очистке ФМЭ от низкомолекулярных примесей с помощью гель-фильтрации удельное содержание активного фермента увеличивалось в 3—4 раза, но светочувствительность фотоматериала при этом не менялась.

2. Фотоиммобилизация светочувствительного модифицированного фермента на носителе



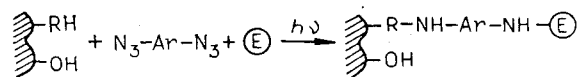
Этот способ отличается тем, что на гидрофильный слой наносится раствор каталитически активного фермента, модифицированного светочувствительным реагентом. При экспозиции фотоактивный фермент иммобилизуется на носителе. Далее следуют закрепление, усиление и проявление скрытого изображения. В качестве светочувствительного фермента использовалась ФМЭ, модифицированная п-диазофенилазидом по методике, предложенной в [6]. В результате азосочетания по ароматическим аминокислотным остаткам тирозина и гистидина образуется фермент,

содержащий светочувствительные группы  $\text{N}_3-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})-\text{R}$  и

$\text{N}_3-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{N}-\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_2-\text{R}$  и сохраняющий ~95% исходной активности. Сте-

пень модификации определяли выделением модифицированного фермента с помощью гель-фильтрации и сравнением спектра его поглощения со спектром поглощения синтезированных модельных соединений на основе тирозина и гистидина. При проведении реакции с большим избытком п-диазофенилазида получали ФМЭ, модифицированную по четырем остаткам тирозина и шести остаткам гистидина. Использование в фотопроцессе очищенной с помощью гель-фильтрации модифицированной ФМЭ с более высокой удельной активностью (в 4—5 раз) вызывает адекватное увеличение светочувствительности.

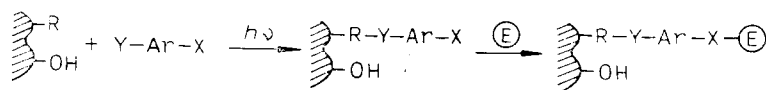
### 3. Одностадийная фотоиммобилизация фермента



заключается в том, что на гидрофильный слой наносится раствор фермента  $\text{E}$  и ароматического диазида  $\text{N}_3\text{-Ar-N}_3$ . При экспонировании

происходит одновременная «пришивка» диазида к ферменту и носителю с образованием скрытого изображения, которое затем закрепляют, усиливают и проявляют. В качестве диазида применяли хорошо растворимое в воде высокоэффективное соединение — 4, 4'-диазидостильбен-2, 2'-дисульфокислоту с концентрацией  $10^{-2}$  М. Дополнительная очистка ФМЭ позволяет получить несколько более высокие фотографические характеристики.

### 4. Двухстадийная фотоиммобилизация фермента



состоит в том, что на листовой сорбент наносится бифункциональный реагент, содержащий химически (X-) и фотохимически (Y-) активные группы, который при экспонировании светом ковалентно «пришивается» к сорбенту за счет фотоактивной группы. Несвязавшийся реагент отмывается, и на скрытое изображение, выполненное из химически активного реагента, присоединенного к сорбенту, наносится раствор фермента, который иммобилизуется связыванием с этим реагентом. При этом образуется скрытое изображение, состоящее из каталитически активного фермента, которое закрепляют, усиливают и проявляют. В качестве бифункционального реагента служил N-оксисукцинимидный эфир 4-(4'-азидофе-

нилазо)-бензойной кислоты  $\text{N}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{-N=N-C}_6\text{H}_4\text{-CO}_2\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ , полученный по

методике, предложенной в [7]. Светочувствительность фотоматериала сильно зависит от степени очистки фермента от низко- и высокомолекулярных примесей.

Каждый из приведенных способов фотоиммобилизации ферментов имеет свои достоинства и недостатки. Фотоиммобилизация на светочувствительном носителе удобна тем, что применяемые в качестве фотокомпоненты ароматические азиды модифицируют белок предпочтительнее, чем целлюлозные носители, не содержащие нуклеофильные группы. Эффективность фотоиммобилизации, а следовательно, и светочувствительность всего фотопроцесса могут быть очень высокими. Данный способ позволяет использовать малоочищенные ферментативные препараты. Недостатки этого способа состоят в следующем: в фотоматериалах, чувствительных к видимому свету, необходимо решать проблему фона, обусловленного собственным поглощением фотокомпоненты, ковалентно присоединенной к носителю. В связи с присутствием фермента в фотоматериале возникает проблема стабильности его при хранении.

Фотоиммобилизация светочувствительного фермента наиболее предпочтительна с точки зрения статистики, поскольку при ее проведении происходит модификация носителя, которого в слое на много порядков больше, чем фермента, и, следовательно, модификация носителя более перспективна для получения высокой чувствительности, особенно если

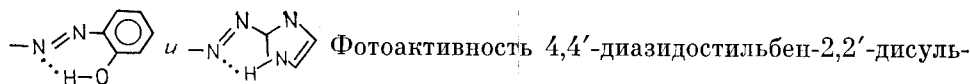
носитель будет содержать группы, хорошо модифицирующиеся фотокомпонентой при экспонировании. Этот способ позволяет получать фотографическое изображение в видимой части спектра практически без фона. ФМЭ модифицируется солями диазония, как правило, по двум различным аминокислотам, при этом образуются две фотокомпоненты с различной спектральной чувствительностью, что расширяет спектральную светочувствительность всего фотопроцесса. Но этот способ связан с химической модификацией фермента и поэтому более требователен к его чистоте. Помимо этого, появляется проблема стабильности модифицированного фермента при длительном хранении.

Одностадийная фотоиммобилизация ферментов с помощью диазидов — наиболее простой, но и наименее эффективный способ получения скрытого изображения. Подобрать условия для перекрестной «сшивки» фермента с носителем очень трудно: происходят либо дублирование носителя, либо множественная модификация фермента. Проблема стабильности фотоматериала при хранении остается. Способ требует использования очищенного фермента.

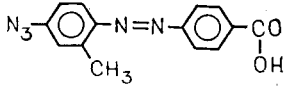
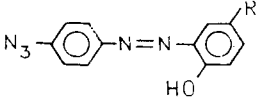
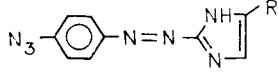
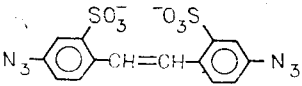
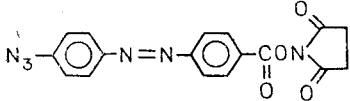
Двухстадийная фотоиммобилизация — наиболее технологичный способ, потому что фермент вводится в фотопроцесс после экспонирования материала перед самым его проявлением, следовательно, проблемы стабильности фотоматериала при хранении не возникает. Фотокомпонента в пробельных участках ковалентно не связана с носителем, она отмывается и не создает фона собственным поглощением. Но для успешной реализации этого способа получения скрытого изображения необходимы использование очищенного фермента, обеспечение эффективности модификации его химически активной группой реагента и высокой стабильности бифункционального реагента при хранении.

На основе этих способов фотоиммобилизации были получены фотоматериалы и оценена их спектральная светочувствительность. Светочувствительность к фильтрованному свету ДРК-120 определяли по характеристической кривой. За критерий светочувствительности принимали превышение плотности в отраженном свете над вуалью на 0,2 о. е. В таблице приведены спектральная светочувствительность этих материалов и фотоактивность модельных соединений в растворе.

Фотоактивность модельных соединений определяли в спиртовом растворе относительно фильтрованного с помощью стеклянных светофильтров света лампы ДРШ-250, снабженной конденсором, с расстояния 40 см. В качестве критерия фотоактивности использовали время полуфотоллиза ( $\tau_{1/2}$ ), которое в отличие от квантового выхода характеризует эффективность не только фотохимической реакции, но и поглощения света данной длины волны. Низкая фотоэффективность азидазокрасителей на основе аминокислот тирозина и гистидина обусловлена, по-видимому, стабилизацией за счет образования внутримолекулярной водородной связи



фокислоты выше, чем азидазокрасителей, что согласуется с [8]. Из приведенных данных видно, что, несмотря на более низкую относительную фотоактивность модельных соединений в растворе, фотоиммобилизация светочувствительного фермента на носителе и фотоиммобилизация фермента на светочувствительном носителе обладают более высокой  $S_{0,2}$ . Отличительной особенностью этих способов является то, что в них фотокомпонента ковалентно присоединена к полимеру (ферменту или носителю). Это предотвращает ее диффузию, затрудняет взаимодействие между молекулами фотокомпоненты и благоприятно сказывается на  $S_{0,2}$ . Низкая светочувствительность материалов, полученных одностадийной, и особенно двухстадийной, фотоиммобилизацией обусловлена кристаллизацией фотокомпоненты на носителе и полимеризацией ее на слое при облучении, а не взаимодействием с полимерной подложкой. Это подтвер-

Модельное соединение	Фотоактивность в растворе $\tau_{1/2}$ , с			Способ фотоиммобилизации	Спектральная светочувствительность $S_{0,2}$ , см <sup>2</sup> /Дж		
	$\lambda_{обл}$ , нм				$\lambda_{обл}$ , нм		
	313	365	405		313	365	405
	90	15	40	1	50	1000	350
	200	180	300	2	1400	50	50
	70	60	450				
	15	1	500	3	30	125	—
	90	7	30	4	—	10	5

ждается ослаблением во втором случае скрытого изображения, состоящего из фотокомпоненты, при увеличении времени отмывок.

Несмотря на указанные недостатки, все способы фотоиммобилизации ферментов работоспособны и имеются реальные возможности для дальнейшего улучшения фотографических характеристик. На примере первого способа получения скрытого изображения была оценена эффективность фотоиммобилизации, т. е. квантовый выход каталитически активного фотоиммобилизованного фермента на квант актиничного света. При экспозиции  $1,5 \cdot 10^{-3}$  Дж/см<sup>2</sup> УФ-светом с  $\lambda = 365$  нм иммобилизуется  $7 \cdot 10^{-12}$  моль/см<sup>2</sup> фермента. Концентрацию фотоиммобилизованного фермента определяли обычным образом по ферментативной активности образца размером 1 см<sup>2</sup>, который после облучения закрепляли отмывкой несвязавшегося фермента, с вычетом активности фотографической вуали. Так как энергия кванта с  $\lambda = 365$  нм  $\sim 260$  кДж/моль, то  $\phi = (7 \cdot 10^{-12} \times 260 \cdot 10^3) / 1,5 \cdot 10^{-3} \sim 10^{-2}$ ; эффективность фотоиммобилизации довольно низкая. Такой низкий выход фотоиммобилизованного фермента определяется и неполным поглощением света материалом, и отличным от 1 квантовым выходом фотолиза фотокомпоненты, и невысокой эффективностью фотомодификации белка из-за наличия большого числа примесей в ферментативном препарате. Можно ожидать, что улучшение этих параметров позволит увеличить  $\phi$  и, следовательно,  $S_{0,2}$ .

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Самохин Г. П., Клибанов А. М., Мартинек К. Фотохимическая иммобилизация ферментов.— Вестн. Моск. ун-та. Сер. Химия, 1978, т. 19, № 4.
2. Мартинек К., Березин И. В. Искусственные светочувствительные ферментативные системы как химические усилители слабых световых сигналов.— Успехи химии, 1979, т. 48, № 11.

3. Сунь Тун, Деревицкая В. А., Роговин З. А. Синтез новых производных целлюлозы и других производных полисахаридов.— ВМС, 1960, т. 2, вып. 12.
4. Хроматография на бумаге/Под ред. И. М. Хайс, К. Мацека.— М.: ИЛ, 1962.
5. Сунь Тун, Чекалин М. А., Роговин З. А. Новый метод получения химически окрашенных волокон.— Журн. прикл. химии, 1961, т. 34, № 1.
6. Emanuel E., Helene R., Gaetan G. 4-azidoaniline, a versatile protein and peptide modifying agent for photoaffinity labelling.— Helv. Chim. Acta, 1979, vol. 64, p. 1217.
7. Jaffe C. L., Lis H., Sharon N. New cleavable photoreactive heterobifunctional cross-linking reagents for studying membrane organization.— Biochem., 1980, vol. 19, p. 4423.
8. Починок А. В. и др. Исследование светочувствительности некоторых ароматических и гетероароматических азидов.— Укр. хим. журн., 1979, т. 45, № 12.

*Поступила в редакцию 8 апреля 1983 г.*

УДК 773.79 : 577.15.087.9

**М. И. ДОБРИКОВ, Г. В. ШИШКИН**  
(Новосибирск)

### ФОТОМАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ФОТОИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ. ЗАВИСИМОСТЬ ФОТОГРАФИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОТ УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ЗАКРЕПЛЕНИЯ, УСИЛЕНИЯ И ПРОЯВЛЕНИЯ СКРЫТОГО ФЕРМЕНТАТИВНОГО ИЗОБРАЖЕНИЯ

Способы фотоиммобилизации ферментов достаточно хорошо проанализированы в литературе [1, 2]. Ковалентная иммобилизация ферментов под действием света — первичная фотохимическая стадия фотопроцесса, квантовый выход которой не может быть больше 1. Основное усиление светового сигнала достигается в ходе каталитической или автокаталитической ферментативной реакции, где коэффициент усиления за короткое время может достигать  $10^6$ — $10^{12}$  [3], что находится на уровне галогеносеребряной фотографии. Для всех бессеребряных фотоматериалов на основе фотоиммобилизованных ферментов закрепление, усиление и проявление являются обязательными операциями. Они определяют максимально достижимый коэффициент усиления и целесообразность применения ферментативных фотоматериалов.

Цель данной работы — рассмотрение влияния условий проведения закрепления, усиления и проявления скрытого изображения на сенситометрические характеристики фотоэнзимоматериалов.

Закрепление скрытого изображения обуславливает соотношение сигнал — фон. Следовательно, обеспечение высокого качества отмывки от ковалентно несвязанного фермента является необходимым условием получения высокой светочувствительности фотоматериалов с ферментативным усилением. При экспонировании фотоматериала в пределах прямолинейного участка характеристической кривой с носителем ковалентно связывается  $5 \cdot 10^{-3}$ — $1 \cdot 10^{-4}\%$  нанесенного фермента. Если необходим коэффициент ферментативного усиления  $10^6$ , то эффективность отмывки, т. е. отношение исходной концентрации фермента к конечной в пробельных участках, должна быть  $10^9/10^4\% = 10^{10}$ . Видно, что на эту операцию приходится очень большая нагрузка, следовательно, ее проведению нужно уделять особое внимание. Задача осложняется тем, что ферменты — высокомолекулярные соединения с заметной физической сорбцией на полимерных носителях. Лабильность ферментов не позволяет применять жесткие отмывки, которые эффективно вымывают белки, но приводят к их необратимой инактивации, т. е. к потере каталитической активности.