

98—99%. Представляло интерес сравнение эффективности стерилизации в каскаде проточных ячеек со стерилизацией в стационарной ячейке. Как было показано [2], снижение выживаемости клеток на 99% в стационарной ячейке с фиксированным объемом воды реализуется при действии одиночного импульса длительностью 220 мкс и напряженностью поля 28 кВ/см. При аддитивном по времени обработки эффекте результат обработки клеток в проточной системе должен быть эквивалентен результату одномоментной обработки с длительностью импульса 280 мкс при той же величине напряженности поля. Однако поскольку в наших опытах при одномоментной обработке в стационарной ячейке амплитуда была несколько больше, чем в проточной системе, можно считать, что эффективность обработки клеток в двух системах примерно одинакова.

К аналогичному выводу привело и сопоставление результатов серии экспериментов, проведенных на каскаде ячеек при амплитуде напряженности поля, равной 22 кВ/см, и выживаемости—4—5%.

Таким образом, показано, что электрическая обработка воды в целях стерилизации ее реализуема не только в стационарной, но и в проточной системе; при этом эффективность обработки в обоих случаях примерно одна и та же.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Тоноян С. А., Сагателян Р. А., Авакян Г. М., Авакян Ц. М., Аракелян В. Б., Джанполадян Н. Л., Симонян Н. В., Степанян А. Г. Биолог. журн. Армении, 42, 9—10, 919—922, 1989.
2. Тоноян С. А., Сагателян Р. А., Авакян Г. М., Авакян Ц. М., Аракелян В. Б., Джанполадян Н. Л., Симонян Н. В., Степанян А. Г. Биолог. журн. Армении, 43, 2, 143—144, 1990.
3. Hamilton W. A., Salt A. J. H. Biochem. et biophys. Acta, 148, 789—90, 1967.
4. Hülshöger H., Potal J., Niemann K.-H. Radiat. Environ. Biophys., 9, 53—63, 1981.
5. Sakurauchi Y., Kondo E. J. J. Agricult. Chem. Soc. Japan, 54, 837—84, 1980.

Поступило 15.III 1990 г.

Биолог. журн. Армении, № 1(45) 1992

УДК 577.352.2

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ С ПОМОЩЬЮ ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Г. Г. АМБАРЦУМЯН, С. Я. АДАМЯН, А. С. НЕГРОСЯН, А. Л. СИМОНЯН

Ереванский физический институт ГКАЭ

*Проницаемость липосом—инкапсулированный фермент—глюкоза—мочевая кислота.*

Для определения проницаемости липосомальной мембраны часто пользуются диализным методом. Применение этого метода связано с трудностями, обусловленными необходимостью учитывать два диф-

фузионных препятствия (липосомальную мембрану и диализный мешок) и необходимостью учета обратного потока [2].

Изучение транспортно-каталитических свойств липосом с инкапсулированным ферментом позволяет избежать эти трудности и определить проницаемость мембраны для соответствующего субстрата. Ранее такого рода работы были проведены для определения проницаемости липосом, сформированных из лецитина с холестерином, для мочевины [5] и аскорбата [6].

Задачей настоящей работы является разработка метода определения проницаемости мембраны бислоиных лецитиновых липосом для глюкозы и мочевой кислоты.

**Материал и методика.** В опытах использовалась глюкозооксидаза (*glucose-oxidase penicillium vitale* 1.3.4) Каменского ПО спиртовой промышленности Мининщепрома Укр. ССР и бактериальная уратоксидаза из *Bacillus fastidiosus* (1733.), получаемая в нашей лаборатории.

Липосомы формировали способом, описанным ранее [1], с той разницей, что дезоксихолат натрия добавляли в смесь хлороформа с метанолом, а при эмульгировании липидной пленки в буфер добавляли фермент. Для инкапсулирования глюкозооксидазы использовали триацетатный буфер (pH 6.5) с 150 мМ KCl, для уратоксидазы — борно-боратный буфер (pH 8.5) с 150 мМ KCl. Концентрация липида 50 мМ, молярное соотношение липид:фермент 1500:1, исходное отношение дезоксихолат натрия: липид R=0.4. Другие значения R указаны в тексте.

Липосомы озвучивали в трубчатом озвучивателе с частотой 22 кГц на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1. Предварительно было установлено, что озвучивание и используемые концентрации дезоксихолата натрия не влияют на активность фермента.

Размер липосом определяли методом светорассеяния. Подробно метод описан в работах [1, 4]. Полученные липосомы имели радиус  $r=1000-1300$  Å.

Для разделения наружного фермента и фермента, инкапсулированного в липосомы проводили гель-фильтрацию на колонке с сефарозой 4В (1:10). О разделении фракций судили по измерению их оптических плотностей, определяемой на спектрофотометре Speord M-40 при длине волны 280 нм.

Активность фермента определяли амперметрически по убыли кислорода в реакционной среде с помощью мембранного электрода. Концентрация субстрата в ячейке варьировала от 10 до 200 мМ глюкозы и от 1 до 4 мМ мочевой кислоты. За единицу активности фермента принимали такое количество его, которое катализирует расход 1 мкмоль кислорода в минуту. Удельную активность выражали числом единиц активности на единицу оптической плотности при 280 нм.

Концентрацию фермента в липосомальной суспензии после проведения через колонку определяли по отношению активности фермента после сольubilизации липосом дезоксихолатом натрия к исходной активности его.

**Результаты и обсуждение.** В работах [5, 6] показано, что при инкапсулировании водорастворимых ферментов максимальная скорость ферментативной реакции не меняется. Этот факт использовался нами для разработки способа определения проницаемости липосомальной мембраны для соответствующих субстратов. При измерении активности ферментов, инкапсулированных в липосомы, наблюдается падение удельной активности, связанное с ограниченным доступом субстрата к ферменту. Это ограничение обусловлено барьерными свойствами липосомальной мембраны. Пользуясь графиком Лайнуивера-Бэрка, можно определить  $K_{m1}$  как для свободного, так и

для инкапсулированного ферментов. Результаты показали, что  $K_m$  для свободного фермента существенно ниже, чем для инкапсулированного (табл.). Следовательно, для достижения одинаковых скоростей реакции инкапсулированный и свободный фермент требуют разных концентраций. Отношение этих концентраций, исходя из уравнения Михаэлиса-Ментен, будет равно отношению  $K_m$  для свободного и инкапсулированного ферментов. С другой стороны, отношение концентрации субстрата в липосомах ( $C_i$ ) к концентрации субстрата в наружном растворе ( $C_n$ ) является функцией проницаемости липосомальной мембраны. Следовательно, проницаемость мембраны можно выразить через отношение  $K_m$ :

$$P = k \frac{V_n}{S} = \frac{C_i \cdot r_1}{3C_n \cdot t} = \frac{K_m \cdot r_1}{3K'_m \cdot t} \quad (1)$$

где  $P$  — проницаемость липосомальной мембраны для субстрата,  $k$  — константа входа субстрата,  $V_n$  — объем наружного раствора,  $S$  — площадь липосом,  $K_m$  — константа Михаэлиса для свободного фермента,  $K'_m$  — константа Михаэлиса для инкапсулированного фермента,  $C_i$  — концентрация субстрата в липосомах,  $C_n$  — концентрация субстрата в наружном растворе,  $t$  — время регистрации,  $r_1$  — радиус липосом.

Значения  $K'_m$  для каталазы и уратоксидазы, а также величины проницаемости липосомальной мембраны  $P$  для глюкозы (Г) и мочевины (МК) при разных отношениях дезоксихолат натрия липид ( $R$ )

$R$	0.4	0.5	0.65	0.75	0.8	0.9
$K'_m$ (мМ) уратоксидазы	14.7	12.3	11	8.2	7.4	5.9
$K'_m$ (мМ) глюкозооксидазы	35.4	—	21.2	—	14.5	11.2
$P \cdot 10^{-10}$ Г (Г)	3.7	4.4	4.8	6.6	7.4	9.2
$P \cdot 10^{-10}$ МК (МК)	3	—	4.5	—	7.5	9.75

Модификация барьерных свойств мембраны должна отражаться на значениях  $K'_m$ . Если увеличить проницаемость мембраны, модифицируя ее детергентом, например, дезоксихолатом натрия [3], то значения  $K_m$  будут уменьшаться до тех пор, пока липосомы не будут сольubilизированы, и они перейдут в смешанные мицеллы. Соответствующие значения  $K'_m$  и рассчитанные по формуле (1)  $P$  при разных  $R$  приведены в таблице.

Таким образом, липосомы с инкапсулированным водорастворимым ферментом представляют собой удобные системы для определения проницаемости липосомальной мембраны по отношению к веществам, которые являются субстратами этих ферментов.

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Амбарцумян Т. Г., Аюбян С. Я., Мариакян Г. Г., Петросян А. С. Биолог. журн. Армении, 40, 3, 200—204, 1987

2. Амбарцумян Т. Г., Адамян С. Я., Марикиан Г. Г., Петросян Л. С. Биофизика, 34, 1, 54—56, 1989.
3. Амбарцумян Т. Г., Марикиан Г. Г., Адамян С. Я., Петросян Л. С., Симонян Л. Х. Биологические мембраны, 6, 4, 386—390, 1989.
4. Кагнин В. Н., Щеголева С. Ю., Лиарушин В. П. Характеристические функции светорассеяния дисперсионных систем. Саратов, 1977.
5. Madeira V. M. Blochim. et Biophys. Acta, 499, 1, 202—211, 1977.
6. Mossa G., Annesini M., Di Giulio A., Dini L., Finazzi-Agro A. Biological and Synthetic Membranes, 227—236, 1989.

Поступило 15.11.1990 г.

Биолог. журн. Армении, № 1 (45), 1992

УДК 577.2

## ДЕЙСТВИЕ ИМПУЛЬСА ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ НА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ ПОКАЗАТЕЛЬ МОЛОКА

С. А. ТОНОЯН, Р. А. САГАТЕЛЯН, Г. М. АВАКЯН, Ц. М. АВАКЯН,  
Н. Б. АРАКЕЛЯН, И. Л. ДЖАНПОЛАДЯН, Н. В. СИМОНЯН, Э. Г. СТЕПАНИ

Ереванский физический институт ГКАЭ

*Молоко—электрический пробой—выживаемость бактерий.*

Обычно для снижения степени обсемененности молока микроорганизмами его пастеризуют или стерилизуют. Наиболее распространенный метод пастеризации или стерилизации молока основан на кратковременном воздействии высокой температуры, которое приводит к гибели значительной части клеток дрожжей, плесени, бактерий группы кишечной палочки и других групп, составляющих микрофлору молока. Однако тепловое воздействие неизбежно приводит также к разрушению многих полезных компонентов молока. В этой связи представляется целесообразным поиск иных методов пастеризации и стерилизации молока. Одним из наиболее эффективных способов может быть кратковременное действие сильного электрического поля. Известно, что кратковременное наложение сильного электрического поля на суспензию клеток бактерий *E. coli*, а также клеток дрожжей [1—3] приводит к гибели значительной части их. Поскольку значительную часть микроорганизмов в молоке составляют клетки бактерий *E. coli* и дрожжей, то следует ожидать, что кратковременное наложение сильного электрического поля на молоко может привести к эффекту его стерилизации.

**Материал и методика.** Электрообработку неразбавленного сырого молока проводили как в ячейке с заданным объемом, так и в проточной ячейке. Для этого были сконструированы генераторы прямоугольных импульсов, работающие в режиме одиночных и периодически повторяющихся импульсов. Первый генератор позволяет получать импульсы напряжения с регулируемой амплитудой (0,4 ÷ 1,6 кВ) и длительностью (10 ÷ 220 мкс), второй — генерирует импульсы напряжением 0 ÷ 3 кВ, длительностью 40 мкс и частотой следования 50 или 100 гц. Форма и амплитуда импульсов контролировались с помощью осциллографа. В первом случае молоко