

УДК 577.152.193

ПРОБЛЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПЕРОКСИДАЗ

Вяткина О.В.

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: oksana_vyatkina@list.ru*

В статье проведен анализ существующих методов выделения пероксидаз из растительного сырья и их очистки, указано, что ни один из них не является универсальным. Приведены результаты исследований, которые подтверждают влияние природы экстрагента на каталитическую активность пероксидазы редьки черной.

Ключевые слова: пероксидаза, экстракция, фракционирование, черная редька.

ВВЕДЕНИЕ

Ферментативный катализ – один из самых перспективных процессов в различных сферах промышленности, науки и медицины. Он обладает множеством особенностей, которые делают использование ферментов более выгодным по сравнению с обычными катализаторами. В промышленных биокаталитических процессах широко используются различные ферменты, но особый интерес представляют собой оксидоредуктазы, в частности растительные пероксидазы [1].

Классическая пероксидаза – двухкомпонентный, двухсубстратный фермент, представляющий собой сочетание активной группы (протогематина IX), выполняющего роль активного центра и коллоидного белкового «носителя», проявляющий высокую специфичность в отношении окислителя – пероксида водорода. Среди субстратов пероксидазы встречаются вещества различной природы, но одними из наиболее легко окисляемых субстратов являются фенолы [2, 3].

В настоящее время наиболее изученной и имеющей активное применение является пероксидаза хрена. Современная технология получения пероксидазы трудоемка, низко продуктивна и связана с использованием сезонного сырья, дорогостоящих импортных хроматографических сорбентов [4–7]. Это определяет и высокую стоимость фермента – стоимость препаратов пероксидазы фирмы «Sigma» варьируется от семи до двух тысяч долларов за 1 грамм в зависимости от качества препарата. Поэтому поиск новых растительных источников пероксидазы и разработка методов её выделения являются актуальной задачей.

При работе с растениями необходимо учитывать некоторые сложности: вариабельность материала, выращенного в открытом грунте, малое содержание белка в экстрактах растений. Кроме того, исследования строения и функций ферментов предполагают наличие высокоочищенных препаратов. Получение же фермента в гомогенном состоянии – достаточно сложная задача. Как правило,

биологический материал, являющийся источником выделения, содержит большое число белков, их комплексов друг с другом и другими биополимерами. Близкие свойства компонентов этой смеси требуют при выделении индивидуальных белков использования разнообразных методов и различных их сочетаний. Трудности получения чистого белка связаны также с лабильностью белков и опасностью их денатурации, что сужает круг возможных методов выделения.

Очистка нативных ферментных препаратов состоит в основном из серии фракционирования. В настоящее время пользуются относительно небольшим числом стандартных приемов, которые оказались особенно эффективными и удобными. Обычно на начальной стадии фракционирования используют либо приём снижения рН системы, что приводит к осаждению большинства нуклеопротеидов, или фракционную денатурацию нагреванием до температуры чуть ниже температуры денатурации фермента, при которой осаждаются большинство балластных белков [8].

Фракционирование органическими растворителями – один из стандартных приемов разделения белков. Чаще всего для этого используют ацетон, этиловый спирт и трихлоруксусную кислоту в сочетании с водными растворами электролитов (например, с сульфатом аммония). Для получения хороших результатов при фракционировании белков ацетоном требуется низкая концентрация электролитов (менее чем М/30), и поэтому желательно предварительно диализовать белковый раствор. Поскольку большинство ферментов инактивируются органическими растворителями при комнатной температуре, необходимо принимать специальные меры для поддержания низкой температуры на всем протяжении работы [9].

Фракционирование солями применяется очень широко. Чаще всего для фракционирования белков употребляют сульфат аммония, так как он хорошо растворим в воде и на большую часть ферментов не оказывает негативного действия. Более того, на многие ферменты он оказывает даже стабилизирующее действие, и потому при работе с ним нет необходимости проводить фракционирование белков при низкой температуре. Даже чистые препараты сульфата аммония имеют слабокислую реакцию; поэтому следует тщательно контролировать рН. Для того чтобы не увеличивать объем, к белковому раствору обычно добавляют твердую соль. Точная концентрация соли, при которой начинается высаливание, определяется не только значением рН, температурой и природой соли, но также и концентрацией фермента [9, 10].

Фракционную адсорбцию можно проводить двумя способами: при первом способе последовательно при перемешивании вносят адсорбент в раствор фермента и затем каждую порцию отделяют центрифугированием. При втором способе ферментный раствор пропускают через колонку с адсорбентом и с помощью коллектора собирают фракции элюата. В первом методе в случае адсорбции фермента его отделяют от других компонентов раствора, а затем экстрагируют или элюируют с адсорбента. Если же фермент не адсорбируется, то обработку адсорбентом можно использовать для удаления из раствора фермента балластных веществ [11].

Различия в скорости перемещения различных белков (как электролитов) в электрическом поле послужили основой для разработки электрофоретических методов очистки ферментов. Большинство из них применимы в аналитических исследованиях при работе с относительно небольшими количествами веществ, тогда как при применении этих методов для разделения относительно больших количеств белков часто возникают трудности. Определенные трудности связаны также с препаративным выделением разделенных веществ. Однако метод электрофореза обладает большой разрешающей способностью и поэтому широко используется в работах по выделению ферментов [9].

Когда фермент достаточно очищен, то в отдельных случаях удается его кристаллизовать. Кристаллизацию ферментов часто проводят из растворов сульфата аммония. Обычный метод состоит в добавлении соли к достаточно концентрированному раствору фермента до появления слабого помутнения. Затем раствор оставляют стоять. При этом постепенно (очень медленно) повышают концентрацию соли. Кристаллизация обычно облегчается, если одной из предшествующих стадий было фракционирование органическим растворителем. Это явление, вероятно, связано с удалением какого-то мешающего кристаллизации материала липидной природы [9, 10].

Последовательность этих приемов фракционирования определяют экспериментальным путем, но в общем можно сказать, что более быстрая очистка достигается сменой различных методов фракционирования, а не повторением однотипных операций.

Известно, что на активность ферментного препарата непосредственное влияние оказывает состав буфера экстрагента, грамотный подбор которого является первым этапом очистки ферментов. Поэтому задачей практической части нашего исследования являлось изучение влияния природы экстрагентов на активность препаратов пероксидазы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась пероксидаза корнеплодов редьки черной. Для получения экстракта растительное сырье подвергли очистке стандартным методом [12] и измельчали на пластмассовой терке. Следует также отметить, что большинство ферментов локализовано внутри растительных клеток. Поэтому для нарушения целостности клеточных стенок измельченную массу дополнительно растирали со стеклянным порошком.

В работе были использованы наиболее часто встречающиеся в литературе экстрагенты: ацетатный буфер (pH=5,75) фосфатный буфер (pH=6,78) боратный буфер (pH=9), 0,5 М раствор хлорида натрия NaCl [4–7, 13]. Определение средней пероксидазной активности ферментного препарата проводили в системе (I) (табл. 1) фотоколориметрическим методом согласно методике Вильштетера [12] на фотоэлектроролориметре KF-77, l=2см, $\lambda=400\text{nm}$). Оксидазную активность ферментных препаратов устанавливали по аналогичной методике в системе (II) без введения пероксида водорода. За единицу активности принимали количество

окисленного субстрата (мкМ), катализированное 1 мл ферментного препарата в течение 1 мин.

$$\text{Активность рассчитывали по формуле: } A = \frac{C \cdot V_c}{V_\phi \cdot \tau}$$

где: τ – время, с;

V_ϕ – объем фермента в исследуемой системе, мл;

V_c – общий объем исследуемой системы, л;

C – концентрация пурпурогаллина, мкМ/л.

Таблица 1

Состав исследуемых систем при определении каталитической активности ферментного препарата

Система (I)	Система (II)
3 мл 3% раствора H_2O_2 ;	–
3 мл 1% раствора $C_6H_3(OH)_3$	3 мл 1% раствора $C_6H_3(OH)_3$
Ферментный препарат*	Ферментный препарат*
H_2O **	H_2O **

Примечание:

* Объем фермента варьировался от 0,5 до 2 мл.

** Общий объем системы довели дистиллированной водой до 10 мл.

Количество белка в экстрактах фермента определяли фотоколориметрически биуретовым методом ($l=5\text{мм}$, $\lambda=540\text{ нм}$) [14].

Контроль pH и Eh в экстрактах ферментов проводили методом прямой потенциометрии. В качестве индикаторных электродов для измерения pH использовали стеклянный электрод, для Eh – платиновый шариковый; Электрод сравнения – хлорсеребряный. Все замеры проводили в свежеразделенном ферментном препарате сразу после центрифугирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в результате проведения эксперимента данные представлены в таблице 2. Необходимо отметить, что интервал pH экстрагентов соответствует ранее установленным значениям кислотности среды, соответствующих максимуму оксидазной и пероксидазной активности ферментного препарата редьки черной [15]. Из приведенных в таблице данных следует, что максимальной пероксидазной активностью обладает ферментный препарат, экстрагированный щелочным боратным буфером, а минимальной – наиболее кислым ацетатным буфером. В тоже время, в отношении оксидазной активности ферментных препаратов наблюдается иная картина – активность максимальна при экстракции в фосфатном буфере и минимальна – в боратном. Также было установлено, что более pH-зависимой является пероксидазная активность препарата, нежели оксидазная. Этот факт, наряду с близкими по значению данными о содержании белка в полученных препаратах, говорит о том, что pH экстрагента практически не оказывает влияние на

полноту извлечения пероксидазы из растительного материала, а резкое отличие скорости окисления пирогаллола в исследуемых системах с пероксидом водорода по-видимому связано с непосредственным влиянием кислотности среды на механизмы и кинетику разложения субстрата окислителя.

Таблица 2

Характеристики ферментных препаратов на основе различных экстрагентов

	Ацетатный буфер	Фосфатный буфер	NaCl (0,5 M)	Боратный буфер
Активность оксидазная (е.а)	4,1±0,05	4,6±0,04	3,9±0,07	3,7±0,04
Активность пероксидазная (е.а)	4,4±0,03	8,0±0,07	6,3±0,06	21±0,14
рН буфера	5,75	6,78	7,00	9,00
рН ферм. преп.	5,75	6,70	6,10	7,90
(-) Eh, В	0,83	0,83	0,50	0,72
С(белка), г/л	19±0,4	15±0,3	21±0,5	20±0,4

Контроль окислительно-восстановительного потенциала Eh во всех полученных экстрактах показал наличие восстановительной среды, что характерно для веществ, входящих в состав внутриклеточной среды растений. Однако явной корреляции между значением Eh-потенциала и активностью фермента на данном этапе работы установлено не было.

Было замечено, что экстрагированный фосфатным буфером ферментный препарат при минимальном содержании в нем белка обладает как значительной оксидазной, так и пероксидазной активностями по отношению к пирогаллолу, что свидетельствует об избирательности данного экстрагента по отношению к пероксидазе.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что не существует единой универсальной схемы получения высокоактивных препаратов растительных пероксидаз.
2. Определено, что пероксидазная активность ферментного препарата, выделенного из корнеплода редьки черной, зависит от природы экстрагента и максимальна в боратном буфере, а оксидазная – в фосфатном.
3. Показано, что рН экстрагента не оказывает влияния на полноту извлечения пероксидазы из растительного сырья, однако является фактором, регулирующим механизм и кинетику разложения пероксида водорода в ферментных системах.
4. Установлено, что фосфатный буфер обладает высокой избирательностью при экстракции пероксидазы из корневищ редьки черной.

Список литературы

1. Рогожин В.В. Peroxidaza kak komponent antioksidantnoy sistemy zhivykh organizmov / В.В. Рогожин. – М.: ГИАРД, 2004. – 240 с.
2. Андреева В.А. Фермент пероксидаза / В.А. Андреева – М.: Наука, 1988. – С. 54–55.
3. Regalado, C. Biotechnological applications of peroxidases / C. Regalado, V. E. García-Almendárez, M. A. Duarte-Vázquez. // *Phytochem. Rev.* – 2004. – Vol. 3, № 1–2. – P. 243–256
4. Пат. 2031946 РФ, МКИ С12N9/08. Способ получения пероксидазы / М.А. Аскарова [KZ], Б.Г. Мухамеджанов [KZ], Р.М. Кунаева [KZ]. – № 5021066; Заявлено 08.01.1992; Опубл. 27.03.1995. Бюл. № 10 – 6 с.
5. Пат. №:2353652., РФ, МПК С12N9/02 Способ получения фермента пероксидазы из корней хрена / Д. В. Бочков (РФ), Т. Г. Толстикова (РФ), А. О. Брызгалов (РФ), М. В. Хвостов (РФ). – №2007135916/13; Заявлено 27.09.2007.; Опубл. 27.04.2009.
6. Пат. №: 2130070. РФ, МПК С12N9/08 Способ получения пероксидазы / А.А. Гусев (РФ), В.Д. Борзионов (РФ), А.С. Красоткина (РФ). – №97119125/13; Заявлено 24.11.1997.; Опубл. 10.05.1999.
7. Пат. №: 2388819. РФ, МПК С12N9/08 Способ получения пероксидазы хрена / В.И. Суровцев (РФ), В.М. Борзенков (РФ), К.В. Детушев (РФ). – №2008125459/13; Заявлено 27.12.2009.; Опубл. 10.05.2010.
8. Плакунов В.К. Основы энзимологии / В.К. Плакунов. – М.: Логос, 2001. – 128 с.
9. Диксон М. Ферменты / М. Диксон, Э. Уэбб. – Т. 1. – М.: Мир, 1982. – 389 с.
10. Скоупс Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс. – М.: Мир, 1985. – 358 с.
11. Волова Т.Г. Биотехнология / Т.Г. Волова. – Новосибирск: СО РАН, 1999. – С. 105–111.
12. Селибер Г.Л. Большой практикум по микробиологии / Г.Л. Селибер. – М.: Мир, 1962. – 492 с.
13. Алпеева И.С. Анионные пероксидазы и их применение в биоанализе: Автореферат. дис. канд. хим. наук: 02.00.15, 03.00.23 / МГУ им. М.В. Ломоносова.– Москва, 2007.– 28 с.
14. Бейли Д. Определение белка. Методы химии белков / Д.Бейли. – М.: Химия, 1965. – 266 с.
15. Лаврентьева И.В. Peroxidaza redьki chernoy – biokatalizator okislenniya fenolov v vodnykh sistemakh / И.В. Лаврентьева, О.В. Вяткина / Збірка тез доповідей III Міжнародної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених НТУУ “КПІ”, ХТФ. – Київ. – 2010. – С. 242.

Вяткіна О.В. Проблеми виділення та очищення рослинних пероксидаз / О.В. Вяткіна // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 271-276.

У статті проведений аналіз існуючих методів виділення пероксидаз з рослинної сировини та їх очищення, зазначено що жоден з них не є універсальним. Наведені результати досліджень, що підтверджують вплив природи екстрагента на каталітичну активність пероксидази редьки чорної.

Ключові слова: пероксидаза, екстракція, фракціонування, редька чорна.

Vyatkina O.V. Problems of allocation and clearing plant peroxidase / O.V. Vyatkina // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 271-276.

In the article analysis of existing plant peroxidases isolation and purification methods indicated that none of them is universal. Results of the studies confirm the influence of extractant nature on the catalytic activity of radish black peroxidase.

Keywords: peroxidase, extraction, fractionation, radish black.

Поступила в редакцію 20.09.2012 г.