

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского
Биология. Химия. Том 5 (71). 2019. № 4. С. 248–261.

УДК 577.152

АНАЛИЗ ПРОБЛЕМЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Вяткина О. В.¹, Бажин В. Ю.¹, Александрова Д. Д.²

¹*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия*

²*Химико-биологический кластер федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики»¹, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: oksana_vyatkina@list.ru*

В статье представлен анализ проблемы репрезентативности исследовательских данных по определению активности ферментов относительно различных субстратов. На примере растительных пероксидаз показана ограниченность методов определения ферментативной активности при высокой субстратной специфичности фермента. Разработана схема определения пероксидазной активности препаратов по субстрату-восстановителю фенолу, указаны оптимальные параметры процесса. Показано, что использование аналитической реакции фенола с 4-аминоантипирином позволяет применять его как субстрат-восстановитель для воспроизводимого оценивания пероксидазной активности очищенных ферментов и ферментных препаратов. Предложен способ косвенного определения пероксидазной активности ферментных препаратов по фенолу, основанный на использовании калибровочных зависимостей, полученных при изучении активности ферментных препаратов с известной степенью очистки в качестве стандарта.

Ключевые слова: пероксидаза, ферментативная активность, фенол, калибровочный график.

ВВЕДЕНИЕ

Уникальная специфичность ферментов и высокие скорости реакций с их участием делают ферменты и препараты, созданные на их основе привлекательными для решения многих задач промышленности, сельского хозяйства, экологии, медицины. Основными источниками ферментов являются «живые» клетки, различного происхождения, но однозначно являющиеся многокомпонентными системами сложного химического состава и физико-химических свойств. Подавляющее большинство ферментов – это вещества белковой природы. Хотя в настоящее время разработаны схемы синтеза и химической модификации активных центров некоторых ферментов, в виду трудоемкости и высокой стоимости данных схем, основным методом получения

ферментов до сих пор является их выделение из биологических объектов. Извлечение фермента из клеточной среды как правило сопряжено с изменением его активности и избирательности под воздействием новых внешних факторов (Т, Р, рН). Для стабилизации фермента, а иногда для повышения его активности проводят процессы очистки препарата либо иммобилизацию. В результате перед исследователями, особенно прикладной направленности, не зависимо от того, где планируется использование полученных препаратов: в аналитических целях либо в технологических схемах, возникает проблема определения их активности и получения при этом данных, которые можно было бы сравнивать с другими данными не зависимо от метода исследования.

При выборе метода необходимо учитывать, что время анализа часто важнее точности. Например, на этапе выделения фермент может инактивироваться по ряду причин, поэтому, затягивать данный этап не целесообразно. То есть, метод, позволяющий за 10 минут определить активность фермента с погрешностью в 5 % предпочтительнее того, что за 30 минут определит активность с погрешностью в 1 %.

Большую сложность представляет работа с выделенными из растительного сырья неочищенными ферментными препаратами, часто содержащими фермент в микроколичествах. При определении активности фермента в таких системах необходимо подобрать правильную «единицу активности», которая бы количественно выражала его чистоту и эффективность действия [1]. В научной среде проблема выбора единиц активности фермента стоит очень остро. Многие исследователи отмечают, что единицы измерения активности, полученные для одного и того же фермента различной степени очистки в системах различного состава относительно разных субстратов сравнивать некорректно, тем более делать выводы об активности фермента и его препаратов относительно других субстратов [2]. Относительно стандартные единицы активности встречаются в работах, где фермент используется в «чистом виде», то есть с заранее установленной степенью очистки, которая чаще всего характеризуется RZ-фактором. За единицу активности (е. а) в таких работах часто принимают количество фермента, окисляющее 1 мкмоль вещества за 1 минуту. Но даже в таких случаях единицы измерений самого количества фермента часто не регламентируются, это может быть, например, массовая доля в мкг фермента на мг материала, молярность раствора фермента, а значит и единицы активности фермента будут отличаться [3–5]. Также для выражения ферментной активности применяются такие единицы как «Катал» и «Молекулярная активность». Последняя единица используется исключительно для чистых ферментов [6–8]. Единицы активности фермента могут выбираться и с учётом изученности структуры фермента. Так, если известно точное количество активных центров в молекуле фермента, то можно использовать «активность каталитического центра» характеризующаяся таким числом молекул субстрата, которое превращается за 1 мин, в расчете на один активный центр. Хотя данная единица активности встречается крайне редко.

Из-за дороговизны чистых ферментов, зачастую в исследованиях используются ферментные препараты, самостоятельно полученные из биоматериалов. Как

правило, оценивание точных концентраций ферментов в таких системах проблематично, поэтому многие авторы предпочитают уходить от абсолютных количественных единиц активности, заменяя их относительными показаниями. При этом, описывая активность исследуемого ферментного препарата, относя его активность к стандартному образцу этого фермента, измеренные в одинаковых условиях, снижается погрешность определения его активности [5–14]. Так же условной единицей активности может выступать изменение оптической плотности системы [15], объем выделившегося или поглощенного в индикаторной реакции газа, интенсивность люминесценции, другое легко регистрируемое изменение системы, вызываемое конкретным количеством фермента, например, массой белка, находящейся в пробе, массой исследуемого препарата, массой исходного растительного сырья, объемом ферментного препарата, полученного из растительного сырья, за определённый промежуток времени [16].

В наших исследованиях для создания аналитических тест-систем и катализаторов водоочистки мы используем препараты с пероксидазной активностью, выделенные из растительного сырья. Пероксидаза является строго специфичной по отношению к пероксиду водорода и широко специфичной – к другим органическим и неорганическим субстратам, среди которых в качестве стандартов обычно применяют пирокатехин (о-диоксибензол), пирогаллол (1,2,3-тригидроксибензол, 1,2,3-тригидроксибензол), гваякол (2-метоксифенол), бензидин (4,4'-диаминодифенил), о-дианизидин, 2,2-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая) кислота (АБТС) и так далее [16, 17]. Однако спектр субстратов-восстановителей пероксидазы намного шире, с чем и связан практический интерес в ее применении, а количество стандартных методик определения ограничено, как и не существует единообразия в количественном выражении единиц активности фермента, что вызывает сложности в оценке эффективности работы катализатора и определении механизма его действия. Также практический интерес представляет сравнение ферментной активности таких препаратов с неким стандартом, в качестве которого выступает, как правило, коммерческая пероксидаза хрена (*Horseradish peroxidase, HRP*) известной степени очистки (*RZ*), активность которой определена производителем по одному из выше перечисленных субстратов, что не дает возможности каким-то образом предположить ее активности относительно иных субстратов, даже близких по химической природе к выше указанным в реальных окислительных системах сложного состава.

Так, например, известно, что фенол является экотоксикантом, попадающим в сточные воды предприятий бумажного, нефтяного, полимерного производств, производств каучука и стали. При хлорировании воды в процессе водоочистки могут образовываться более токсичные производные хлорфенолы [18]. Именно для удаления фенола и его хлорпроизводных из сточных вод в процессе доочистки чаще всего и используются пероксидазы [19]. Вполне логично и полезно было бы при разработке новых ферментных катализаторов с пероксидазным действием оценивать их активность именно относительно реальных загрязнителей, сравнивая ее с активностью эталонного фермента и при этом получать унифицированные,

имеющие тождественный физический смысл данные, пригодные для сопоставления и анализа. Однако методика определения активности фермента по этим субстратам отсутствует, вследствие многокомпонентности систем, сложности механизмов протекающих реакций и проблем подбора аналитических реагентов для контроля остаточных концентраций субстрата. В связи с этим для нас интерес представляла разработка унифицированного способа определения пероксидазной активности ферментных препаратов на примере нестандартного субстрата восстановителя – фенола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась пероксидаза, выделенная из корнеплодов редьки черной (*Raphanus sativus 'Niger'*). Экстрагировали фермент фосфатным буфером (рН=7) из очищенного и измельченного растительного сырья. Экстракцию проводили по методике, описанной Селибером без дальнейшей очистки [20]. Супернатант отделяли от растительной массы центрифугированием при 5000 об., содержание нативной пероксидазы в нем оценивали по количеству активных центров феррипорфирина пероксидазы (далее а.ц.) в единице объема, фотоколориметрически ($\lambda = 400$ нм, $l = 2$ см, $\varepsilon_{400} = 9,6 \cdot 10^4 \frac{\text{л}}{\text{моль} \cdot \text{см}}$) [3]. В качестве

стандарта использовали очищенную пероксидазу хрена (*HRP*), (производитель: «Budapest Hungary», RZ 0,6). Общее содержание белка в системах, содержащих фермент, определяли биуретовым методом по калибровочному графику ($\lambda = 540$ нм, $l = 1$ см) [21].

В качестве субстрата-окислителя использовали пероксид водорода производства «РОСБИО», точную концентрацию которого устанавливали методом перманганатометрического титрования [22].

Субстратом-восстановителем был выбран фенол, чда, производства «ВИТАХИМ», дополнительно очищенный перегонкой. Концентрацию фенола в водных растворах определяли фотоколориметрически, по реакции с 4-миноантипирином в присутствии катионов Fe^{3+} , (рН=10,0, $\lambda=470$ нм, $l=1$ см) [23]. Все фотоколориметрические определения проводили на приборе ЭКСПЕРТ-003.

В связи с тем, что нами не было найдено сведений об использовании чистого фенола в качестве субстрата для определения активности ферментных препаратов на основе пероксидазы, на первом этапе исследований возникла необходимость в разработке такого метода. Для этого было необходимо подобрать оптимальные условия: время экспозиции, концентрацию фермента и концентрации субстрата-окислителя, при которых количество субстрата-восстановителя в системах изменялось бы со временем линейно. Это необходимо для определения начальной скорости реакции, а, следовательно, и активности ферментного препарата.

Суммарный объем системы составлял 0,05 л. Систему А – стандарт: пероксидаза хрена RZ 0,6, H_2O_2 , $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$, использовали для подбора оптимальных условий определения активности пероксидазы по фенолу. Система В - тестовая: фосфатно-буферный экстракт пероксидазы редьки черной, H_2O_2 , $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$. Концентрацию (а.ц.) фермента в системах варьировали от $1 \cdot 10^{-9}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, что

соответствовало $C(HRP)=4 \cdot 10^{-2} - 4 \cdot 10^2$ мг/л. Концентрацию H_2O_2 в системе А варьировали от 1 до $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, содержание фенола от $3 \cdot 10^{-6}$ до $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. В системе В использовали установленные по результатам исследования системы А оптимальные концентрации субстратов окислителя и восстановителя.

В качестве растворителя во всех системах использовали фосфатный буфер с $pH = 7$. Все измерения проводили при комнатной температуре ($t = 25$ °С). Время экспозиции, τ , при подборе оптимальных условий определения начальных скоростей реакции варьировали в интервале 1 – 30 мин. По истечении заданного времени в систему добавляли 1 мл 1 М H_2SO_4 для инактивации фермента и остановки реакции. Скорость реакции определяли по изменению концентрации фенола.

Активность ферментных препаратов определяли по начальной скорости окисления субстрата-восстановителя. За единицу удельной активности, при работе с очищенным ферментом, приняли количество субстрата (мкМ), окисленного в присутствии 1 мг ферментного препарата на протяжении 1 минуты, по формуле:

$$A = \frac{\Delta C \cdot V}{g \cdot \tau} \quad (1)$$

Где: ΔC – изменение концентрации субстрата (мкмоль/л) за время экспозиции системы τ (мин); V – объем окислительной системы (л); g – навеска ферментного препарата (мг).

За единицу молярной активности, при работе с очищенным ферментом, приняли количество субстрата (мкМ), окисленного в присутствии 1 моль ферментного препарата на протяжении 1 минуты, по формуле:

$$A = \frac{\Delta C \cdot V}{n \cdot \tau} \quad (2)$$

Где: ΔC – изменение концентрации субстрата (мкмоль/л) за время экспозиции системы τ (мин); V – объем окислительной системы (л); n – количество вещества ферментного препарата (моль).

В системах В активность нативной пероксидазы, выражали так же количеством субстрата (мкМ), окисленного в присутствии 1 мкмоль активных центров ($n_{a.c.}$) ферментного препарата за 1 минуту.

По данным определения активности по фенолу для стандарта – очищенной пероксидазы, строили различные виды калибровочных зависимостей, связывающих аналитический сигнал с массой и количеством а.ц. фермента. Данные зависимости использовали для оценки активности пероксидазы, экстрагированной из растительного сырья без дополнительной очистки. Обработку результатов проводили методами математической статистики в программе «Microsoft Excel».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований показали, что в системах (А), при фиксированной начальной концентрации фенола $5 \cdot 10^{-4}$ М в присутствии различных концентраций пероксида водорода и варьировании времени экспозиции τ , наблюдалось линейное

снижение оптической плотности аналитического раствора, а, следовательно, уменьшение остаточной концентрации фенола в системе в течении первых 10 мин. После чего наблюдалось возрастание фиктивного светопоглощения вследствие появления в системе мути, обусловленной конденсацией продуктов окисления фенола [24]. В виду чего временем экспозиции во всех дальнейших экспериментах было выбран промежуток 10 мин.

Варьирование содержания субстрата окислителя в системах (А) показало, что при концентрации H_2O_2 ниже $1 \cdot 10^{-3}$ М достоверно определяемых изменений концентрации фенола в течении времени экспозиции не происходило. Аналогичная картина наблюдалась при внесении в системы пероксидазы в концентрациях ниже $1 \cdot 10^{-8}$ М. Поэтому мы ограничились, в дальнейших исследованиях, более узкими интервалами концентраций указанных компонентов. Так в системах с фиксированной концентрацией фермента $1 \cdot 10^{-7}$ М (A_1) и $1 \cdot 10^{-6}$ М (A_2) были получены зависимости скорости реакции от начальной концентрации субстрата окислителя, показанные на (рис. 1, 2). Видно, что при малых концентрациях субстрата-окислителя эти зависимости носят линейный характер, что соответствует первому порядку реакции по основному субстрату. При концентрациях пероксида водорода больше 0,08 М в системе (A_1) и больше 0,02 М (A_2), кривые зависимостей скоростей реакции от концентрации субстрата-окислителя выходят на плато, т.е. порядок реакции становится близким к нулю, что полностью соответствует схеме Михаэлиса-Ментен [25].

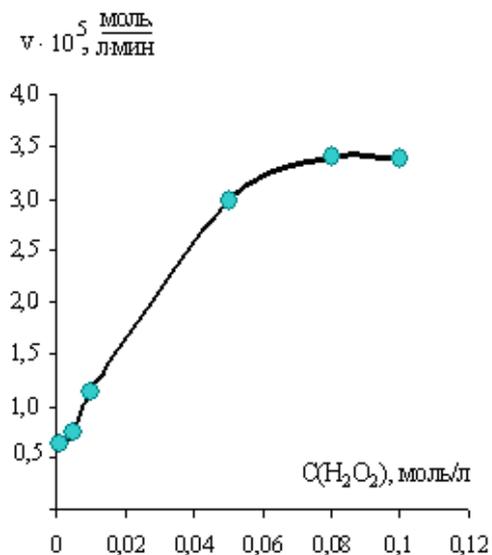


Рис. 1. Зависимость скорости пероксидазного окисления фенола от концентрации субстрата окислителя. $C(HRP) = 1 \cdot 10^{-7}$ М (A_1)

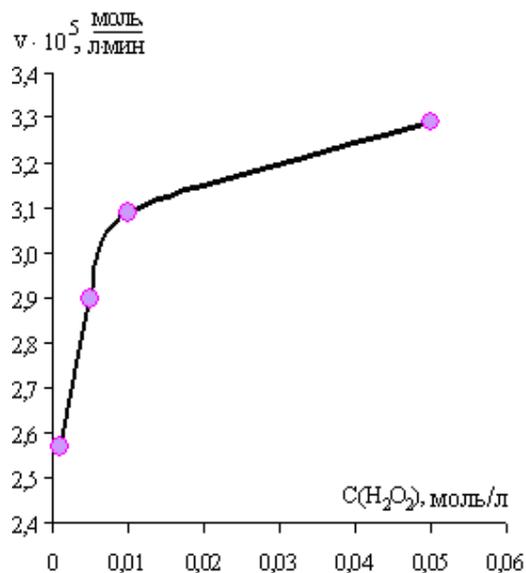


Рис. 2. Зависимость скорости пероксидазного окисления фенола от концентрации субстрата окислителя. $C(HRP) = 1 \cdot 10^{-6}$ М (A_2)

В системе (A₂) не удалось достоверно зафиксировать остаточные концентрации фенола по истечении выбранного времени экспозиции из-за высокой активности фермента для концентраций пероксида водорода выше $8 \cdot 10^{-2}$ М. Поэтому, для дальнейшей работы по созданию калибровочной зависимости активности фермента по фенолу от его концентрации в системе, рабочей концентрацией пероксида водорода выбрано $5 \cdot 10^{-2}$ М, а рабочий диапазон концентрации фермента $1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-6}$ М. Правильность выбора рабочих концентраций реагентов, для определения начальных скоростей пероксидазного окисления фенола, подтверждается данными эксперимента, приведёнными на (рис. 3), где наблюдается линейное возрастание скорости реакции, с увеличением концентрации субстрата-восстановителя, что полностью соответствует начальному участку кинетической зависимости по схеме Михаэлиса-Ментен, первому порядку реакции.

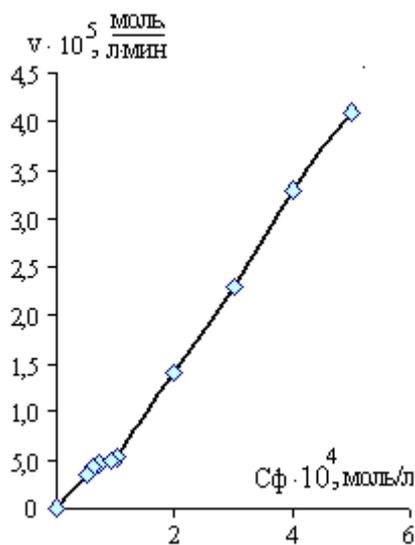


Рис. 3. Зависимость скорости реакции пероксидазного окисления фенола от концентрации субстрата. ($C(\text{C}_6\text{H}_5\text{OH})= 5 \cdot 10^{-5}$ – $5 \cdot 10^{-4}$) М; $C(\text{H}_2\text{O}_2)=5 \cdot 10^{-2}$ М; $C(\text{HRP})=1 \cdot 10^{-7}$ М; $\tau=10$ мин, $\text{pH}=7$).

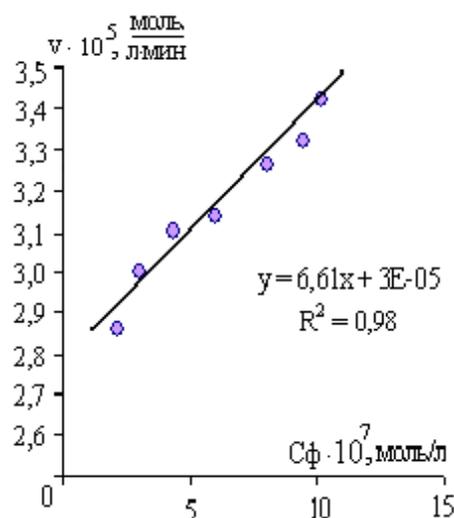


Рис. 4. Зависимость начальных скоростей пероксидазного окисления фенола от концентрации фермента (HRP) (системы A_{1,2})

Следовательно, для определения активности исследуемого фермента по начальным скоростям пероксидазного окисления фенола оптимально использовать системы следующего состава: $C(\text{C}_6\text{H}_5\text{OH})= 5 \cdot 10^{-5}$ – $5 \cdot 10^{-4}$ М; $C(\text{H}_2\text{O}_2)=5 \cdot 10^{-2}$ М; $C(\text{HRP})=1 \cdot 10^{-7}$ М; $\text{pH}=7$, $\tau=10$ мин. Варьирование в окислительных системах (А) концентрации фермента в рабочем диапазоне позволило определить его удельную активность по начальным скоростям окисления фенола. В результате была получена классическая линейная зависимость, представленная на (рис.4.), которую можно использовать как калибровочную для определения активности препаратов с

пероксидазной активностью, в том числе ферментов, выделенных из растительного сырья без дополнительной очистки. Средние расчетные значения пероксидазной активности фермента-стандарта по фенолу приведены в табл. 1.

Таблица 1
Средняя активность пероксидазы хрена очищенной (RZ 0.6) по фенолу
(система А)

Молярная активность \tilde{A}_c , моль субстрата/моль фермента · 1 мин.	Удельная активность \tilde{A}_m , мкмоль субстрата/мг фермента · 1 мин, (е.а)	1 (МЕ), моль (п)/моль (ф)·мин *
$8 \cdot 10^6$	0,18	$1,3 \cdot 10^{-7}$

* Международная единица активности (МЕ или U) – количество фермента (моль), катализирующие превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин.

Таким образом, в системе (А), эффективная активность по фенолу 1 мг фермента составляет 0,18 е.а, что позволяет нам представить следующие виды калибровочных зависимостей, представленных на рис.5, 6.

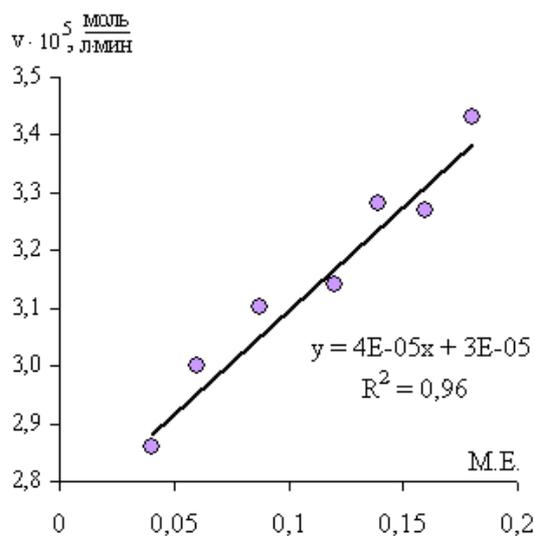


Рис. 5. Зависимость начальной скорости реакции пероксидазного окисления фенола от эффективной активности фермента (HRP).

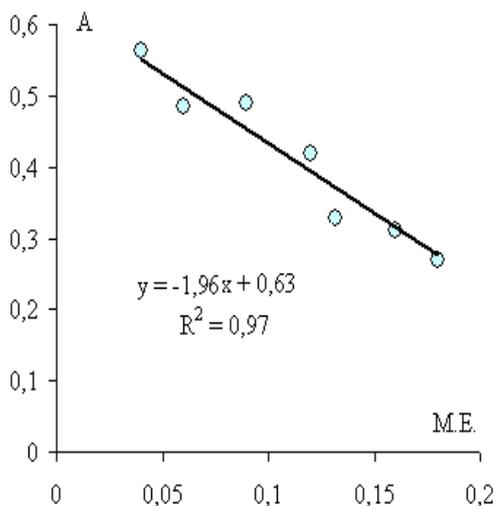


Рис. 6. Зависимость оптической плотности индикаторных систем от эффективной активности фермента (HRP).

Используя представленные зависимости при изучении скорости пероксидазного окисления фенола в присутствии ферментного препарата любого происхождения и

любой степени чистоты, достаточно будет либо определить в них начальные скорости реакции, либо только зафиксировать оптические плотности систем при определении остаточных концентраций фенола, а затем путем экстраполяции или расчетным методом определить эффективную активность исследуемого ферментного препарата по имеющимся зависимостям. Иначе активности ферментных препаратов, определенных различными методами, не будут иметь смысла при сопоставлении результатов.

Данный способ был применён для определений пероксидазной активности по фенолу и степени чистоты ферментного препарата, экстрагированного из корнеплода редьки черной (система (В)), где предварительно фотоколориметрическим методом по закону Бугера–Ламберта–Бера, при $\lambda_{(400\text{nm})}$ принимая, что $\varepsilon_{400} = 9,6 \cdot 10^4$ л/(моль·см) устанавливали концентрацию активных центров пероксидазы (Са.ц.) и рассчитывали ее теоретическую массу, считая, что М (пероксидазы редьки) = 40000 [24]. Также рассчитывали теоретическую пероксидазную активность фермента по фенолу, исходя из его условного содержания в системе, используя данные табл.1. В том же экстракте определяли массу белка биуретовым методом. Полученные данные сравнивали с результатами определения эффективной пероксидазной активности фермента по фенолу, предложенным нами способом калибровочной прямой. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Содержание и активность пероксидазы в фосфатно-буферном экстракте из корнеплода редьки черной, установленные различными методами (Vсистем =0,05л)

Экспериментально определенные величины		Расчетные параметры	
Концентрация активных центров фермента	Са.ц.= $3 \cdot 10^{-6}$ моль/л.	Теоретическая масса фермента $m_{п.т.}=6\text{мг}$	Теоретическая активность $A_t=1,1$ М.Е.
Масса белка в пробе	$m_B=1,7\text{мг}$		
		Параметры определенные по калибровочным прямым рис. 5,6	
Конечная оптическая плотность окислительной системы с фенолом	$A=0,61$	Эффективная масса фермента $m_{п.эф.}=0,05\text{мг}$	Эффективная активность $A_{эф.}=0,009$ М.Е.
Начальная скорость пероксидазного окисления фенола	$v=1,32 \cdot 10^{-5}$ МОЛЬ Л · МИН		

Из приведенных данных следует, что в неочищенном экстракте пероксидазы редьки черной, при λ_{400} поглощает не только гемм пероксидазы. Расчётные значения определяли по закону Бугера–Ламберта–Бера, из значений оптической плотности. Возможно, что высокая оптическая плотность системы обусловлена ее микрогетерогенностью и фиктивным характером светопоглощения, о чём свидетельствует чрезвычайно высокое расчетное значение количества фермента и его теоретическая активность по фенолу в МЕ, а также, масса фермента в более чем в три раза превышающая массу белка, определенного в том же экстракте биуретовым методом. Данные полученные при определении начальной скорости окисления фенола исследуемым экстрактом и данные интерпретированные с помощью калибровочных зависимостей (рис. 5, 6), по оптической плотности аналитических систем с остаточными концентрациями фенола, показывают, что реальной пероксидазной активностью обладает лишь 3 % от всех присутствующих в системе веществ белковой природы. Данный вывод вполне логичен, для неочищенного экстракта. Очевидно, что результаты, полученные предложенным нами методом определения пероксидазной активности выделенного неочищенного препарата с пероксидазной активностью, более объективны и унифицированы.

Для более строгого доказательства эффективности и универсальности предложенного метода определения активности было бы целесообразно построить калибровочные зависимости аналитического сигнала, характеризующего активность ферментного препарата с известной степенью чистоты, относительно других стандартных субстратов определения активности ферментов, например, для пероксидазы – 1,2,3-пирогалла, пирокатехина и другие.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. По результатам кинетических исследований были определены оптимальные условия и состав окислительных систем для определения начальных скоростей пероксидазного окисления фенола: $C(C_6H_5OH) = 5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$ М; $C(H_2O_2) = 5 \cdot 10^{-2}$ М; $C(HRP) = 1 \cdot 10^{-7}$ М; pH=7, $\tau=10$ мин.
2. Показано, что использование аналитической реакции фенола с 4-аминоантипирином позволяет использовать его как субстрат восстановитель для воспроизводимого оценивания пероксидазной активности очищенных ферментов и ферментных препаратов.
3. Предложен способ косвенного определения пероксидазной активности ферментных препаратов по фенолу, основанный на использовании калибровочных зависимостей, полученных при использовании ферментных препаратов с известной степенью очистки качестве стандарта.

Список литературы

1. Диксон М. Ферменты: Пер. с англ. / М. Диксон, Э. Уэбб. – М.: Мир, 1982. – Т. 1 – 392 с.
2. Лекарственные препараты из растительного сырья. Пероксидаза / Г. Ф. Давыдова, О. А. Ермаков, А. И. Панасенко // Химия растительного сырья. – 1998. – № 1. – С. 15–18.

3. Рогожин В. В. Роль индолил-3-уксусной кислоты в реакциях окисления быстро и медленно окисляемых субстратов пероксидазы / В. В. Рогожин, Т. В. Рогожина // Вестник Московского университета. – Серия 2. Химия. – 2004. – Т. 45, № 6. – С. 423–428.
4. Рогожина Т. В. Стационарная кинетика индивидуального и совместного окисления фенотиозинов в присутствии пероксидазы хрена / Т. В. Рогожина, В. В. Рогожин // Электронный журнал «ИССЛЕДОВАНО В РОССИИ». – 2002. – Т. 70. – С. 768–780.
5. Имобилизация пероксидазы в поли-*n*-винилкапролактаме / И. И. Романовская, О. В. Осейчук, О. В. Севостьянов, [и др.] // Вісник ОНУ. – 2005. – Т. 10, Вып. 8. – С. 49–54.
6. Пестовский Ю. С. Имобилизация пероксидазы хрена в гидрогеле и микрочастицах альгината кальция / Ю. С. Пестовский // Научный журнал КубГАУ. – 2013. – № 92, Т. 8. – С. 16.
7. Лягин И. В. Каталитические характеристики фермент-полиэлектролитных комплексов на основе гексагистидинсодержащей органофосфатгидролазы / И. В. Лягин, Е. Н. Ефременко, А. В. Кабанов // Вестник Московского университета. – Серия 2. Химия. – 2014. – Т. 55, № 3. – С. 167–173.
8. Шеховцова Т. Н. Определение ртути (II) с использованием пероксидазы, ковалентно иммобилизованной на модифицированных силикагелях / Д. Л. Григорьева, И. А. Веселова, Т. Н. Шеховцова // Вестник Московского университета. – Серия 2. Химия. – 2003. – Т. 44, № 3. – С. 178–182.
9. Ермоленко Д. А. Изучение стабильности и сворачивания белков на примере убиквитина и пероксидазы: автореф. дисс. канд. биол. наук: 03.00.04 / Д. А. Ермоленко. – М., 2003. – 22 с.
10. Кудряшов А. П. Исследование стабильности препаратов иммобилизованной пероксидазы / А. П. Кудряшов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Междунар. науч. конф.; Десятый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, 19–21 июня 2012 г. Минск, Беларусь: сб. ст.: в 2 ч. Ч. – Минск: Изд. Центр БГУ. – 2012. – С. 42–45.
11. Catalytic activity and stability of glucose oxidase/horseradish peroxidase co-confined in macroporous silica foam / X. Cao, Y. Li, Z. Zhang, J. Yu, [et al] // The Royal Society of Chemistry. Analyst. – 2012. – Vol. 137. – P. 5785–5791.
12. Коновалова Е. В. Разработка количественного анализа серологических маркеров рака предстательной железы на гидрогелевых микрочипах: автореф. дисс. канд. физ-мат. наук: 03.00.02 / Е. В. Коновалова. – М., 2006. – 23 с.
13. Кирейко А. В. Пероксидаза в полиэлектролитном комплексе и мицеллах поверхностно-активных веществ для определения ее субстратов и эффекторов в водно-органических средах: автореф. дисс. канд. хим. наук: 02.00.02 / А. В. Кирейко. – М., 2009. – 24 с.
14. Яблоцкий К. В. Новые аспекты применения нативной и иммобилизованной пероксидазы для определения ее ингибиторов и субстратов: автореф. дисс. канд. хим. наук: 02.00.02 / К. В. Яблоцкий. – М., 2010. – 25 с.
15. Виноградова Е. Н. Кинетические свойства и компонентный состав пероксидазы листьев *POPULUS DELTOIDES MARSH.* и *FRAXINUS LANCEOLATA BORKH.* в условиях техногенного загрязнения / Е. Н. Виноградова // Промышленная ботаника. – 2007. – Вып. 7. – С. 63–68.
16. Методы биохимического исследования растений / А. И. Ермаков [и др.]. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 456 с.
17. Метелица Д. И. Иницирование и ингибирование свободнорадикальных процессов в биохимических пероксидазных системах (обзор) / Д. И. Метелица, Е. И. Карасёва // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, №5. – С. 537–564.
18. Тихонов Б. Б. Биокатализатор для очистки сточных вод от фенола на основе иммобилизованной пероксидазы хрена / Б. Б. Тихонов, А. И. Сидоров, Э. М. Сульман // Катализ в промышленности. – 2007. – № 3. – С. 48–50.
19. Use of Enzymes to Remove Organic Micropollutants from Potable Water / B. Dussert, J. P. Duguet, J. Manem [et al] // Studies in Environmental Science. – 1986. – Vol. 29. – P. 655–662.
20. Большой практикум по микробиологии / Г. Л. Селибер. [и др.]. – Москва: Мир, 1962. – 492 с.
21. Ронин В. С. Руководство к практическим занятиям по методам клинических лабораторных исследований. / Ронин В. С., Старобинец Г. М. – М.: Мир, 1989. – 285 с.

22. Аналитическая химия: учебное пособие для студентов фармацевтических вузов и факультетов III–IV уровней аккредитации / В. В. Болотов [и др.]. – Харьков: НФАУ «Золотые страницы», 2001. – 305 с.
23. Лурье Ю. Ю., Химический анализ производственных сточных вод / Ю. Ю. Лурье, А. И. Рыбникова – М.: Химия, 1974. – 336 с.
24. Рогожин В. В. Peroксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов / В. В. Рогожин. – М.: ГИАРД, 2004. – 240 с.
25. Тарасевич Б. Н. ИК спектры основных классов органических соединений (Справочные материалы) / Б. Н. Тарасевич. – М.: МГУ им. М. В. Ломоносова, 2012. – 55 с.

ANALYSIS OF THE PROBLEM OF DETERMINING THE ACTIVITY OF ENZYME PREPARATIONS

Vyatkina O. V.¹, Bazhin V. U.¹, Alexandrova D. D.²

¹*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia*

²*Chemical-Biological Cluster of federal national independent educational establishment of the high education "St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics", St. Petersburg, Russia*

E-mail: oksana_vyatkina@list.ru

This article presents an analysis of the problem of representatives of research data on the determination of enzyme activity in relation to various substrates. We have shown many units of activity of enzyme preparations with various purifications used in modern studies. Also the impossibility of comparing units with each other. The limitations of the methods for determining the enzymatic activity with the highest substrate specificity of the enzyme are shown by the example of plant peroxidases. Phenol is a common ecotoxicant and is used as the main agent that reduces peroxidase. The problem of comparing the effectiveness of enzyme preparations with various degrees of purification is shown. Due to the impossibility of comparing unit activity. To solve this problem, a scheme was developed for determining the peroxidase activity of drugs by phenol as a reducing substrate and the optimal process parameters were indicated. Using the analytical interaction between phenol and 4-aminoantipyrine allows it to be used as a reducing agent for the reproducible assessment of the peroxidase activity of purified enzymes and enzyme preparations. A method for indirect determination of peroxidase activity of enzyme preparations by phenol based on the use of calibration dependencies is proposed. The following relationships were constructed in this study: 1. the dependence of the rate of phenol oxidation by peroxidase on the concentration of hydrogen peroxide; 2. the dependence of the rate of peroxidase oxidation of phenol on the initial concentration of the substrate; 3. The dependence of the initial rates of peroxidase oxidation of phenol on the concentration of the enzyme (HRP); 4. The dependence of the initial reaction rate of peroxidase oxidation of phenol on the effective activity of the enzyme (HRP); 5. The dependence of the optical density of indicator systems on the effective activity of the enzyme (HRP). The method for determining activity proposed in the study was tested to determine the activity of a crude enzyme extracted from black radish root. The difference

in the values of the activity of the crude enzyme calculated according to the constructed dependencies and the theoretical value of the total protein mass is shown. Features of using the described method are revealed, possible limits of applicability for extremely inactive enzymes are indicated, and theoretical solutions to the identified shortcomings are proposed.

Keywords: peroxidase, enzyme activity, phenol, schedule of calibration.

References

1. Dixon M., Webb E., *Enzymes*: Trans. from English, 392 p. (Mir, Moscow, 1982). (in Russ.)
2. Davydova G. F., Ermakov O. A., Panasenko A. I., Medicines from plant materials. Peroxidase. *Chemistry of plant raw materials*, **1**, 15, (1998).
3. Rogozhin V. V., Rogozhina T. V., The role of indolyl-3-acetic acid in the oxidation reactions of rapidly and slowly oxidized peroxidase substrates, *University Physics Bulletin*, **45** (6), 423, (2004).
4. Rogozhina T. V., Rogozhin V. V., Stationary kinetics of individual and combined oxidation of phenothiazines in the presence of horseradish peroxidase, e-print "RESEARCHED IN RUSSIA", **70**, 768, (2002).
5. Romanovskaya I. I., Oseychuk O. V., Sevostyanov O. V., Immobilization of peroxidase in poly – n-vinylcaprolactam, *Visnik ONU*, **10**, 49, (2005).
6. Pestovsky Y. S., Immobilization of horseradish peroxidase in the hydrogel and microparticles of calcium alginate, *Scientific journal KubSAU*, **8**, 8, (2013).
7. Lyagin I. V., Efremenko E. N., Kabanov A. V., Catalytic characteristics of enzyme-polyelectrolyte complexes based on hexahistidine-containing organophosphate, *Moscow University Physics Bulletin*, **55**, 167, (2014).
8. Shekhovtsova T. N., Grigoryeva D. L., Veselova I. A., Determination of mercury (II) using peroxidase covalently immobilized on modified silica, *Moscow University Physics Bulletin*, **44**, 178, (2003).
9. Ermolenko D. A., The study of stability and folding of proteins on the example of ubiquitin and peroxidase: abstract. diss. Cand. biol. Sciences: 03.00.04, 22 p., (2003).
10. Kudryashov A. P., Investigation of the stability of immobilized peroxidase preparations, *Intern. scientific conf.; Tenth Congress of the Belarusian Public Association of Photobiologists and Biophysicists*, (BGU, Minsk, 2012), 42.
11. Cao X., Li Y., Zhang Z., Yu J., Catalytic activity and stability of glucose oxidase/horseradish peroxidase co-confined in macroporous silica foam, *The Royal Society of Chemistry. Analyst*, **137**, 5785, (2012).
12. Konovalova E. V., Development of a quantitative analysis of serological markers of prostate cancer on hydrogel microarrays: author. diss. Cand. physical mat. Sciences: 03.00.02, 23 p., (2006).
13. Kireiko A. V., Peroxidase in the polyelectrolyte complex and micelles of surface-active substances to determine its substrates and effectors in aqueous-organic media: abstract. diss. Cand. Chem. Sciences: 02.00.02, 24 (2009).
14. Yablotsky K. V., New aspects of the use of native and immobilized peroxidase to determine its inhibitors and substrates: abstract. diss. Cand. Chem. Sciences: 02.00.02, 25 p., (2010).
15. Vinogradova E. N., Kinetic properties and component composition of leaf peroxidase *POPULUS DELTOIDES MARSH.* and *FRAXINUS LANCEOLATA BORKH.* In conditions of technogenic pollution, *Industrial botany*, **7**, 63, (2007).
16. Ermakov A. I., Methods of biochemical research of plants, *Agropromizdat*, **1**, 456, (1987).
17. Metelitsa D. I., Karaseva E. I. Initiation and inhibition of free radical processes in biochemical peroxidase systems (review), *Applied Biochemistry and Microbiology*, **43**, 537, (2007).
18. Tikhonov B. B., Sidorov A. I., Sulman E. M., Biocatalyst for wastewater treatment from phenol based on immobilized horseradish peroxidase, *Catalysis in industry*, **3**, 48, (2007).
19. Dussert B., Duguet J. P., Manem J., Use of Enzymes to Remove Organic Micropollutants from Potable, *Studies in Environmental Science*, **29**, 655, (1986).
20. Seliber G. L., *A large workshop on microbiology*, p. 492, (Mir, Moscow, 1962). (in Russ.)
21. Ronin V. S., Starobinets G. M., *Guide to practical exercises on clinical laboratory research methods*, p. 285, (Mir, Moscow, 1989). (in Russ.)

22. Bolotov V. V., *Analytical chemistry: a textbook for students of pharmaceutical universities and faculties of III – IV levels of accreditation*, 305 p., (Golden Pages, Kharkov, 2001). (in Russ.)
23. Lurie Y. Y., Rybnikova A. I., *Chemical analysis of industrial wastewater.*, 336 p., (Chemistry, Moscow, 1974). (in Russ.)
24. Rogozhin V. V., *Peroxidase as a component of the antioxidant system of living organisms*, p. 240, (GIARD, Moscow, 2004). (in Russ.)
25. Tarasevich B. N., *IR spectra of the main classes of organic compounds* (Reference materials), 55 p., (State University. M. V. Lomonosova, Moscow, 2012). (in Russ.)