

УДК 577.152.193

МЕТОДЫ ПОВЫШЕНИЯ И СТАБИЛИЗАЦИИ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ РЕДЬКИ ЧЕРНОЙ

Вяткина О.В.

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

Установлены оптимальные условия экстракции пероксидазы из корнеплода редьки черной: время, температура, массовое соотношение растительное сырьё/экстрагент. Проведён сравнительный анализ влияния очистки фермента фракционированием, криоконсервации и иммобилизации на водонерастворимых подложках на скорость инактивации фермента при хранении. Показано, что средняя скорость инактивации замороженного при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ фосфатно-буферного раствора фермента соизмерима со скоростью инактивации иммобилизованных на силикагеле и бентоните пероксидаз. Учитывая простоту реализации, метод криоконсервации может быть рекомендован нами как эффективный метод стабилизации активности пероксидазы редьки черной.

Ключевые слова: пероксидаза, криоконсервация, иммобилизация, фракционная очистка, инактивация.

ВВЕДЕНИЕ

В промышленных биокаталитических процессах широко используются различные ферменты, но особый интерес представляют собой оксидоредуктазы, в частности растительные пероксидазы. Однако перспективы использования растительных пероксидаз в промышленности, водоочистке, химическом анализе зачастую ограничены низкой стабильностью и активностью нативного фермента. Значительное повышение активности и устойчивости фермента происходит при его очистке и выделении в кристаллическом виде. Однако, схема очистки достаточно сложна, требует больших временных и финансовых затрат [1]. Другим способом повышения устойчивости активности растительных пероксидаз является их иммобилизация на водонерастворимых подложках [2]. Но одним из наиболее простых методов сохранения активности нативных ферментных препаратов является их хранение при низких температурах, в частности, в замороженном состоянии.

Так как ранее мы проводили исследования стабилизации ферментов путём иммобилизации на водонерастворимых подложках, то в данной работе представлены данные по изучению влияния криоконсервации и очистки фракционированием на активность пероксидазы редьки черной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись фосфатно-буферные (pH=6,8) и ацетатно-буферные (pH=5,75) экстракты пероксидазы корнеплодов редьки черной.

Экстракцию фермента из очищенного и измельченного растительного сырья проводили в течение 15 мин по стандартной методике, описанной Селибером [3].

Полученные экстракты пероксидазы редьки черной замораживали при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и выдерживали от 5 до 40 суток. После чего в размороженных растворах определяли пероксидазную активность по начальной скорости реакции пероксидазного окисления гидрохинона ($t=10$ мин, $t=25\text{ }^{\circ}\text{C}$) в системах I, II, III, где концентрация гидрохинона равна $0,00002$ моль/л, концентрация пероксида водорода – $0,01$ моль/л, объем ферментного препарата варьировал соответственно от 1 до 3 мл, общий объем системы 50 мл. Изменение концентрации гидрохинона в исследуемых системах контролировали фотоколориметрическим методом по реакции с *o*-фенантролином в присутствии ионов Fe^{3+} [4]. За единицу активности принимали количество окисленного субстрата (мкмоль), катализированного 1 мл ферментного препарата в течение 1 мин.

Удельную ферментативную активность рассчитывали по формуле:

$$\bar{A} = \frac{\Delta C \cdot V}{V_{\text{п}} \cdot t}; \quad (1)$$

Где: $\Delta C = C_{\text{н}} - C_{\text{к}}$ – концентрация прореагировавшего гидрохинона, мкм/л;

V – объем окислительной системы, л;

t – время реакции, мин;

$V_{\text{п}}$ – объем используемого экстракта пероксидазы, мл.

Другим критерием, характеризующим активность ферментного препарата, считали степень конверсии гидрохинона в исследуемых системах (α , %)

$$\alpha = \frac{C_{\text{н}} - C_{\text{к}}}{C_{\text{н}}} \cdot 100\% \quad (2)$$

Где:

$C_{\text{н}}$ – начальная концентрация $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$ в системе;

$C_{\text{к}}$ – конечная концентрация $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$ в системе.

Кроме того, были определены рН, Eh и содержание белка в свежеполученных растворах и после 40 суток замораживания. Контроль рН и Eh проводили методом прямой потенциометрии. Измерения проводили на иономере универсальном ЭВ-74: электрод сравнения – хлорсеребряный; индикаторные электроды – рН (стеклянный), Eh (платиновый). Содержание белка устанавливали фотоколориметрическим методом по биуретовому способу [5].

Для определения оптимальных условий экстракции пероксидазы из корнеплодов редьки черной фосфатным и ацетатным буферными растворами варьировали следующие параметры:

- 1) температуру процесса от 15 до $40\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 2) время экстракции от $0,5$ ч до 24 ч;
- 3) массовое соотношение фаз (растительное сырьё/экстрагент) $1:1$ и $1:10$.

Затем полученные в оптимальных условиях экстракты пероксидазы подвергли очистке методом высаливания сульфатом аммония. В ходе исследований концентрация соли была $3,2$ моль/л; температура $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Время осаждения – 24 часа.

Фермент также очищали путем осаждения в системе ацетон– $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, где концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ равна 0,2 моль/л. Соотношение объемов экстракта пероксидазы, раствора сульфата аммония и использование ацетона составляло $V_{\text{II}}:V_{\text{C}}:V_{\text{A}}=1:1:1$. Осаждение проводили при температуре 4 °С, в течение 24 часов.

Полученные осадки отделяли центрифугированием при 8000 об. в течение 10 мин. После центрифугирования осадок высушивали при комнатной температуре, затем растворяли в 10 мл дистиллированной воды. После чего определяли содержание белка и пероксидазную активность полученного препарата по гидрохинону. Аналогичные измерения повторяли через 5 суток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На начальном этапе исследования были установлены исходные характеристики полученных ферментных препаратов, представленные в таблице 1.

Таблица 1

Содержание белка, Eh и pH в экстрактах пероксидазы редьки черной до и после замораживания

Время опыта	Ацетатный буфер				Фосфатный буфер			
	pH	Eh (mV)	Белка, г/л	A, е.а.	pH	Eh (mV)	Белка, г/л	A, е.а.
30 мин	5,3	-70	15±0,6	0,055	6,9	-105	17±0,3	0,100
40 суток	5,6	180	17±0,4	0,011	6,55	187	19±0,4	0,026

Было установлено, что активность относительно гидрохинона исходного ацетатно-буферного экстракта пероксидазы редьки черной практически в 2 раза ниже активности фосфатно-буферного экстракта фермента, что связано с более низким содержанием белка, более высокой кислотностью среды и подтверждается более высоким значением Eh-потенциала системы. Данные, полученные в ходе изучения динамики изменения активности исследуемых ферментных препаратов, представлены на рис. 1, 2.

Как видно из рис. 1, при замораживании фосфатно-буферного экстракта пероксидазы редьки черной в течении 19 суток в системах I и II степень конверсии гидрохинона достигает 100%. Незначительное уменьшение степени конверсии субстрата наблюдается во всех исследованных системах, начиная с 28 суток. В системах с ацетатно-буферным экстрактом пероксидазы редьки чёрной (рис. 2) установили, что степень конверсии гидрохинона остаётся относительно стабильной при использовании экстракта пероксидазы, замороженного в течении 7 суток. Более длительные времена замораживания фермента приводят к снижению его активности на 80%, что подтверждается зависимостями, представленными на рис. 3, 4.

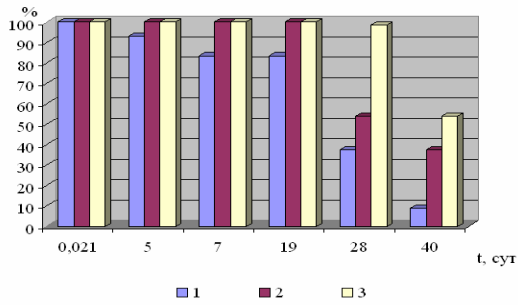


Рис. 1. Изменение степени ферментативной конверсии гидрохинона после хранения фосфатно-буферного экстракта пероксидазы в замороженном виде. 1 – система (III); 2 – система (II); 3 – система (I).

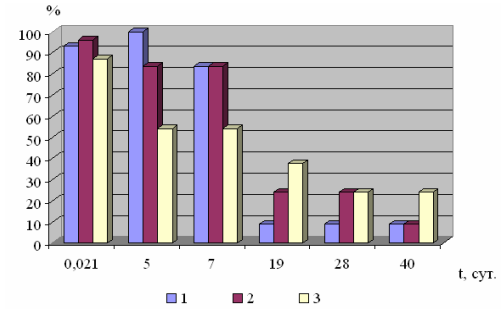


Рис. 2. Изменение степени ферментативной конверсии гидрохинона после хранения ацетатно-буферного экстракта пероксидазы в замороженном виде. 1 – система (III); 2 – система (II); 3 – система (I).

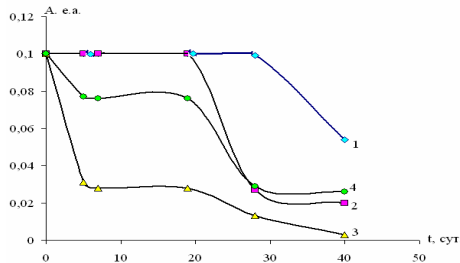


Рис. 3. Динамика снижения активности фосфатно-буферного экстракта пероксидазы редьки черной после хранения в замороженном виде. 1 – система (I); 2 – система (II); 3 – система (III); 4 – средняя активность в системах (I, II, III).

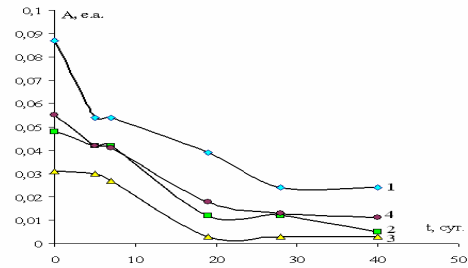


Рис. 4. Динамика снижения активности ацетатно-буферного экстракта пероксидазы редьки черной после хранения в замороженном виде. 1 – система (I); 2 – система (II); 3 – система (III); 4 – средняя активность в системах (I, II, III).

Уменьшение активности пероксидазы при длительном замораживании очевидно обусловлено тем, что во время замораживания водных растворов, вода из раствора трансформируется в кристаллы льда, оставляя безводные компоненты сконцентрированными в сильно уменьшенном количестве жидкой воды. При этом в растворе существенно изменяются рН, ионная сила, вязкость, поверхностные и межфазные натяжения и окислительно-восстановительный потенциал, что может приводить к изменению степени диссоциации функциональных групп макромолекул фермента, степени их сольватации, а, следовательно, к агрегации либо к распаду субъединиц, то есть к изменению конформации молекул фермента на уровне четвертичной и даже третичной структуры белка.

Изменения значений рН и Eh в исследуемых системах нами были подтверждены экспериментально (табл. 1). Таким образом было установлено, что эффективной криоконсервация при температуре -20°C для фосфатно-буферных экстрактов пероксидазы редьки черной является в течении 19 суток, а для ацетатно-буферного экстракта не более 7 суток.

Начальной стадией выделения пероксидазы из растительного сырья является экстракция фермента различными водными растворами. На рисунках 5–8 представлены диаграммы отражающие влияние температуры, времени экстракции, массовых соотношений растительное сырьё/экстрагент, рН системы на активность выделенного фермента.

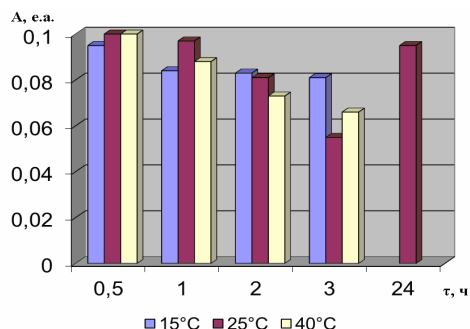


Рис. 5. Влияние температуры и времени экстракции на активность препарата пероксидазы корнеплодов редьки черной Экстрагент – фосфатный буфер (рН=6,8)

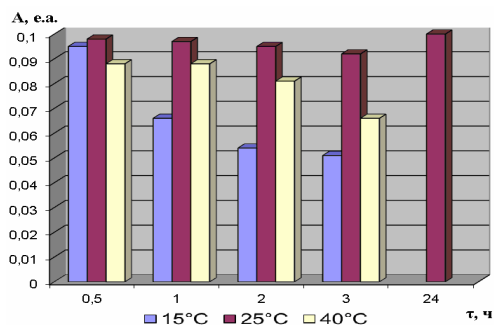


Рис. 6. Влияние температуры и времени экстракции на активность препарата пероксидазы корнеплодов редьки черной Экстрагент – ацетатный буфер (рН=5,75)

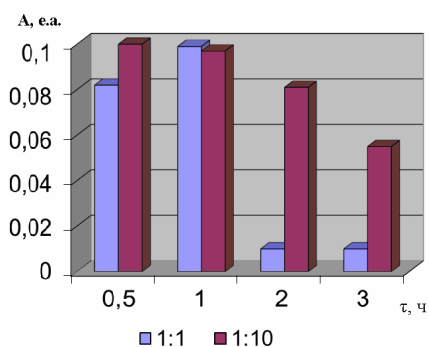


Рис. 7. Влияние массового соотношения фаз (растительное сырьё/экстрагент) и времени экстракции на активность препарата пероксидазы корнеплодов редьки черной. Экстрагент – фосфатный буфер (рН=6,8)

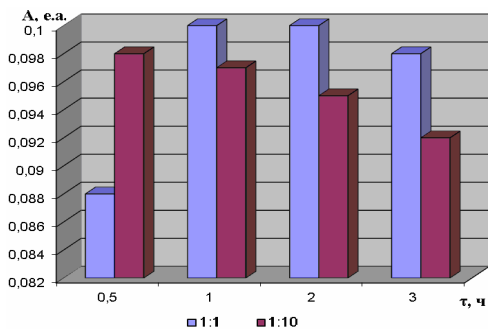


Рис. 8. Влияние массового соотношения фаз (растительное сырьё/экстрагент) и времени экстракции на активность препарата пероксидазы корнеплодов редьки черной. Экстрагент – ацетатный буфер (рН=5,75)

В ходе эксперимента было установлено, что оптимальными условиями экстракции пероксидазы из корнеплода редьки черной является время 30 мин., температура 25 °С и массовое соотношение растительное сырьё/экстрагент 1:10 как в случае использования фосфатного так и ацетатного буфера. Результаты определения активности препаратов пероксидазы, экстрагированных буферными растворами в оптимальных условиях и очищенных методом высаливания и осаждением в системе с ацетоном и сульфатом аммония, представлены в табл. 2.

Таблица 2

Активность и содержание белка в препарате пероксидазы редьки черной, очищенной фракционированием

Реагент-осадитель	Фосфатный буфер (рН=6,8)		Ацетатный буфер (рН=5,75)	
	А, е.а	С _{белок} , г/л	А, е.а	С _{белок} , г/л
24 ч				
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,3±0,2	138 ±2	7,0±0,4	145 ±2
(CH ₃) ₂ CO-(NH ₄) ₂ SO ₄	9,0±0,2	192±3	7,3±0,2	149 ±3
120 ч				
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,3±0,2	137 ±2	7,0±0,4	145 ±2
(CH ₃) ₂ CO-(NH ₄) ₂ SO ₄	9,0±0,2	194±3	7,3±0,2	148 ±2

Из таблицы видно, что очистка пероксидазы высаливанием из фосфатно-буферного экстракта повышает активность ферментного препарата в 53 раза, осаждением в системе с ацетоном – в 90 раз. Для пероксидазы, полученной из ацетатно-буферного экстракта в обоих случаях после очистки активность увеличилась приблизительно в 70 раз. При хранении в течение 120 часов полученного препарата при температуре 4°С изменения активности пероксидазы не наблюдалось. Полученные данные по ферментативной активности коррелируют с количеством белка в системах.

Обобщенные данные по динамике инактивации нативной пероксидазы редьки черной и стабилизированной путём криоконсервации, фракционной очистки и иммобилизации на водонерастворимых подложках приведены в таблице 3. Ранее было установлено, что нативный фермент теряет свою активность уже в течение первых двух часов – она уменьшается на 50% [6]. Иммобилизация же фермента увеличивает срок его хранения. Так, в течение 14 суток средняя пероксидазная активность в системе с гидрохиноном уменьшилась менее чем на 10%, а в случае фермента, иммобилизованного на силикагеле, в течение 30 суток средняя молярная пероксидазная активность в системе с гидрохиноном уменьшилась на 7% [7]. Также было установлено, что средняя скорость инактивации замороженного при –20 °С

фосфатно-буферного раствора фермента соизмерима со скоростью инактивации иммобилизованных на силикагеле и бентоните пероксидаз.

Таблица 3
Динамика инактивации нативной пероксидазы редьки черной и после различных видов обработки

пероксидаза	pH	ΔA , %	Δt	$w = \Delta A / \Delta t$, %/сут.
нативная	6,8	50	0,08 сут. (2 ч)	625
	5,75	32	0,08 сут. (2 ч)	400
замороженная	6,8	10	19	0,53
		74	40	1,85
	5,75	24	7	3,4
		80	40	2
осаждённая (NH ₄) ₂ SO ₄	6,8	0	5	0
	5,75			
осажденная (CH ₃) ₂ CO-(NH ₄) ₂ SO ₄	6,8	0	5	0
	5,75			
иммобилизованная на бентоните	–	10	14 сут.	0,7
иммобилизованная на силикагеле	–	7	30 сут.	0,2

Учитывая простоту реализации, данный метод может быть рекомендован нами как метод стабилизации активности пероксидазы редьки черной. Полученные нами путём фракционной очистки ферментные препараты отличались стабильностью активности при хранении, однако в данном случае необходимо изучение активности данных препаратов при более длительном хранении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что оптимальными условиями экстракции пероксидазы из корнеплодов редьки черной является время 30 мин., температура 25 °С и массовое соотношение растительное сырьё/экстрагент 1:10 как в случае использования в качестве экстрагента фосфатного, так и ацетатного буфера.
2. Очистка пероксидазы высаливанием из фосфатно-буферного экстракта повышает активность ферментного препарата в 53 раза, осаждением в системе с ацетоном – в 90 раз. Для пероксидазы, полученной из ацетатно-буферного экстракта в обоих случаях после очистки активность увеличивается 70 раз. Активность препаратов стабильна при хранении в течение 120 часов.
3. Установлено, что оптимальная длительность криоконсервации при –20 °С для фосфатно-буферных экстрактов пероксидазы редьки черной составляет 19 суток, а для ацетатно-буферного экстракта – не более 7 суток. Показано, что средняя скорость инактивации замороженного при –20 °С фосфатно-буферного

раствора фермента соизмерима со скоростью инактивации иммобилизованных на силикагеле и бентоните пероксидаз. Учитывая простоту реализации, данный метод может быть рекомендован нами как метод стабилизации активности пероксидазы редьки черной.

Список литературы

1. Скоупс Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс. – М.: Мир, 1985. – 425 с.
2. Березин И.В. Иммобилизованные ферменты / И.В. Березин, Н.Л. Клячко, А.В. Левашов. – М.: Высш. шк., 1987. – 159 с.
3. Селибер Г.Л. Большой практикум по микробиологии / Г.Л. Селибер. – М.: Мир, 1962. – 492 с.
4. Лурье Ю.Ю. Химический анализ производственных сточных вод / Ю.Ю. Лурье, А.И. Рыбников. – М.: Химия, 1974. – 395 с.
5. Бейли Д. Определение белка. Методы химии белков / Д. Бейли. □ М.: Химия, 1965. – 266 с.
6. Вяткина О.В. Каталитична активність пероксидази редьки чорної щодо субстратів відновників різної природи. / О.В. Вяткіна, І.В. Лаврентьєва, М.О. Єрмакова // Вісник Львівського університету. – 2012. – В. 53. – С. 357–362.
7. Ermakova M.O. Immobilization as a stabilization and regulation method of peroxidase radish black substrate specificity / M.O. Ermakova, O.V. Vyatkina // Peer-reviewed articles 8th International Bata Conference for Ph.D. Students and Young Researchers. – 2012. – Vol. 8, № 116. – P. 1–8.

Вяткіна О.В. Методи підвищення та стабілізації активності пероксидази редьки чорної / О.В. Вяткіна // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 261-269.

Встановлені оптимальні умови екстракції з коренеплоду редьки чорної пероксидази: час, температура, масове співвідношення рослинна сировина/екстрагент. Проведений порівняльний аналіз впливу очищення ферменту фракціонуванням, кріоконсервування та іммобілізації на водо нерозчинних підкладках на швидкість інактивації ферменту при зберіганні. Показано, що середня швидкість інактивації замороженого при –20 °С фосфатно-буферного розчину ферменту порівняна з швидкістю інактивації пероксидаз, що іммобілізовані на силикагелі та бентоніті. Беручи до уваги легкість реалізації, даний метод може бути рекомендований нами як метод стабілізації активності пероксидази редьки чорної.

Ключові слова: пероксидаза, кріоконсервування, іммобілізація, фракційне очищення, інактивація.

METHODS OF IMPROVEMENT AND STABILIZATION OF ACTIVITY BLACK RADISH PEROXIDASE

Vyatkina O.

*Taurida V.I. Vernadskiy National University, Simferopol, Ukraine
E-mail: oksana_vyatkina@list.ru*

A great number of enzymes are used in the industrial biocatalytic processes, the oxidoreductases, and vegetation peroxidases in particular, contributing the biggest interest among them. However, the prospects of the vegetation peroxidases usage in manufacturing industry, water purification, and chemical analysis are often limited by low native enzyme permanency and activity. The considerable increase of the enzyme activity and constancy happens during its purification and crystallize separation. However, the purification pattern is quite complicated, requiring large time and financial spending. The

other way of the increase of the vegetation peroxidases enzyme activity is their immobilization on the water - insoluble surface. But one of the easiest ways of the activity preservation for the native enzyme compounds is their low – temperature storage, in particular in frozen condition. Thus, the purpose of this work was studying the efficiency of the vegetation peroxidases stabilization methods mentioned.

The study was made of black radish peroxidase. The inactivation dynamics of native, frozen under the temperature of -20°C , immobilized and purified by the enzyme fractionating during its storage was identified by the peroxidase oxidation speed of the hydroquinone. The obtained data of inactivation dynamics of black radish peroxidase ($w=\Delta A/\Delta\tau$, % per day: ΔA , % – change of molar peroxidase activity, $\Delta\tau$, per day) are represented:

native peroxidase – $\text{pH}=6,8$, $\Delta\tau=0,08$, $w=625\%$ per day, $\text{pH}=5,75$ $\Delta\tau=0,08$, $w=400\%$ per day;

frozen peroxidase – $\text{pH}=6,8$, $\Delta\tau=19$, $w=0,53\%$ per day, $\Delta\tau=40$, $w=1,85\%$ per day;

frozen peroxidase – $\text{pH}=5,75$, $\Delta\tau=7$, $w=3,4\%$ per day, $\Delta\tau=40$, $w=2,0\%$ per day;

peroxidase precipitated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – $\text{pH}=6,8$, $\Delta\tau=5$, $w=0\%$ per day, $\text{pH}=5,75$ $\Delta\tau=5$, $w=0\%$ per day;

peroxidase precipitated $(\text{CH}_3)_2\text{CO}-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – $\text{pH}=6,8$, $\Delta\tau=5$, $w=0\%$ per day, $\text{pH}=5,75$ $\Delta\tau=5$, $w=0\%$ per day;

immobilized on bentonite peroxidase - $\Delta\tau=14$, $w=0,7\%$ per day;

immobilized on silica – $\Delta\tau=30$, $w=0,2\%$ per day.

In the course of research it was fixed that the medium inactivation speed of the frozen under -20°C phosphatic – buffering enzyme solution is proportional to the inactivation speed of the bentonite and silica immobilized peroxidase. Taking into account the easiness of realization, this method can be recommended by us as an activity stabilization method of black radish peroxidase. The enzyme compounds obtained by us during the fractionating purification also were especially stable while being stored, however in this case the study of the mentioned compounds activity during longer storage time is required.

Keywords: peroxidase, frozen, immobilization, fractionating purification, inactivation.

References

- 1 Scopes R., Methods of protein purification, 425 p. (Mir, Moscow, 1985). (in Russ.).
- 2 Berezin I.V., Klyachko D., Levashov A.V., Immobilized enzymes, 159 p. (Vysshaya Shkola, Moscow, 1987). (in Russ.).
- 3 Seliber G.L., A large workshop in microbiology, 492 p. (Mir, Moscow, 1962). (in Russ)
- 4 Lurie Y.Y., Rybnikov A.I., Chemical analysis of industrial waste water, 395 p. (Khimiya, Moscow, 1974). (in Russ.).
- 5 Bailey D., Determination of protein. Methods chemistry of proteins, 266 p. (Khimiya, Moscow, 1965). (in Russ.).
- 6 Vyatkina O.V., Lavrent'eva I.V., Ermakova MO, Catalytic activity of peroxidase black radish relatively substrates reducing agents of different nature, *Visnyk of Lviv University*, **53**, 357 (2012).
- 7 Ermakova M.O., Vyatkina O.V., Immobilization as a stabilization and regulation method of peroxidase radish black substrate specificity, *Peer-reviewed articles 8th International Bata Conference for Ph.D. Students and Young Researchers*, **8**(116), 1 (2012).

Поступила в редакцию 29.01.2014 г