

І. І. Романовська<sup>1</sup>, О. В. Севастьянов<sup>1</sup>, В. А. Топтіков<sup>2</sup>  
ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ О. В. БОГАТСЬКОГО НАН УКРАЇНИ<sup>1</sup>, ОДЕСА  
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА<sup>2</sup>

## ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ І ВЛАСТИВОСТЕЙ ВИДІЛЕНОГО З ХРОНУ ПРЕПАРАТУ ПЕРОКСИДАЗИ

З коренів хрону способом осадження білків сульфатами цинку й амонію, шляхом використання полімеру і діалізу виділено препарат пероксидази (RZ 0,70) з виходом білка 1,7 %, питомою окисно-відновною активністю 7,6 Од. Із застосуванням SDS-електрофорезу показано отримання частково очищеного препарату пероксидази з молекулярною масою основної фракції (43±0,5) кДа. Методом нативного електрофорезу встановлено, що 80,8 % загального білка препарату мають виражену пероксидазну активність.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пероксидаза хрону, електрофорез, біохімічні властивості.

ВСТУП. Пероксидаза хрону (ПОХ) – глікопротеїд з молекулярною масою близько 44 кДа, двосубстратно-двопродуктний фермент, який містить протогематин IX, що відіграє роль активного центру, і власне білок та проявляє високу специфічність щодо окиснювача – пероксиду водню. Найбільш типовими субстратами пероксидази є феноли, індоли, ароматичні аміни і сульфонати [1]. Даний ензим – лідер використання в ферментативному каталізі – застосовують як модельний об'єкт, для розробки імунологічних тестів, тест-смужок, створення біосенсорів; елімінації фенольних поллютантів, у генній терапії та органічному синтезі [4].

Сучасні технології отримання пероксидази трудомісткі й пов'язані з використанням сезонної сировини, токсичних органічних розчинників, низької температури, дорогих імпортованих хроматографічних сорбентів, що визначає високу вартість препаратів пероксидази [3]. Тому вдосконалення способу виділення ПОХ і дослідження особливостей складу ензиму є актуальними завданнями.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Частково очищений препарат ПОХ отримували шляхом подрібнення 1 кг коренів хрону, відокремлення соку і жмиху, екстракції жмиху дистильованою водою та 1 М NaCl із центрифугуванням 20 хв при 20 000 г, 4 °С. Далі насичували об'єднані отримані супернатанти сульфатами цинку, по-

© І. І. Романовська, О. В. Севастьянов, В. А. Топтіков, 2015.

тім амонію до 35–100 % насичення при ~0 °С із послідовним центрифугуванням протягом 1 год при 10 000 г. Осад ресуспендували в дистильованій воді, додавали відповідну концентрацію поліетиленгліколю (ПЕГ-1500), центрифугували (0 °С, 30 хв, 2500 г) з наступним діалізом верхньої фази проти дистильованої води. У виділеному препараті ПОХ визначали вміст білка за методом Брадфорда [2], концентрацію пероксидази – за величиною оптичної густини при 403 нм, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання  $\epsilon=102\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; окисно-відновну активність – за пірогалолом [6]. За одиницю пероксидазної активності брали кількість ферменту, що каталізує утворення 1 мкмоль пурпурогаліну з пірогалолу за 1 хв при рН 6,0 і 25 °С [4]. В отриманому ферментному препараті визначали спектральний показник чистоти ( $RZ=A_{403}/A_{275}$ ). Білково-фракційний склад препарату досліджували за допомогою SDS-електрофорезу в 10 % ПААГ у системі Леммлі, забарвлення здійснювали з використанням Кумасі R-250. Нативний електрофорез проводили в 10 % ПААГ за Орнстейн і Девіс [5]. Одну частину гелю забарвлювали Кумасі R-250 для прояву білкових фракцій, іншу – обробляли субстратом ПОХ для виявлення ферментативної активності.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Із соку і жмиху коренів хрону шляхом поєданого використання сульфату цинку і міжфазного розподілу пероксидази хрону ПЕГ-1500 виділили частко-

во очищений препарат ензиму. Основні етапи виділення і біохімічні властивості препарату ПОХ із коренів хрону наведено в таблиці 1.

Отримано препарат ПОХ із виходом білка 1,7 %, питомою активністю 7,6 Од. Показано, що додавання  $ZnSO_4$  для видалення баластних білків та фенолів з подальшим висолюванням сульфатом амонію сприяло збільшенню RZ в 1,6 і 13,2 раза

відповідно. Встановлено, що додавання полімеру ПЕГ-1500 після  $(NH_4)_2SO_4$  для фракціонування ензиму методом розділення фаз [7] призвело до підвищення питомої активності та ступеня чистоти препарату ПОХ, відповідно, в 1,1 і 30 разів, а наступний діаліз дозволив збільшити питому пероксидазну активність ще на 21 %, RZ – на 23 %.

Таблиця 1 – Характеристика етапів виділення пероксидази хрону

Препарат	Вміст білка		Пероксидазна активність		RZ
	всього, мг	вихід білка, %	Од	всього, Од	
Сік хрону	2678±40	100	5,62±0,17	12649±367	0,028
Водний екстракт жмиху	2021±92		5,71±0,0	8613±115	0,028
Сольовий екстракт жмиху	5381±94		2,76±0,03	5942±63	0,013
	2480±43		5,99±0,07		
Об'єднаний екстракт* після додавання $ZnSO_4$	4832±110	66,8	4,12±0,08	20815±323	0,03
Фракція 35–100 % насичення $(NH_4)_2SO_4$	671±28	9,35	5,64±0,02	7162±330	0,25
Фракція після додавання полімеру	177±8	2,48	6,29±0,05	5048±200	0,57
Препарат після діалізу	121±5	1,7	7,6 ±0,05	4010±125	0,70

Примітка. \* – значення RZ в об'єднаному екстракті до обробки  $ZnSO_4$  становило 0,019.

Електрофоретичні дослідження білково-фракційного складу отриманого препарату (рис. 1, а) показали наявність трьох білкових фракцій з М.м. основної фракції (43±0,5) кДа, що відповідає такій пероксидази. З використанням нативного електрофорезу в препараті ПОХ виявлено три білкові фракції (рис. 1, б). Дані таблиці 2

свідчать про те, що чистота отриманого препарату становить 80,8 % (сума фракцій № 1–3; фракція № 4 представлена неактивним білком). Представлені білкові фракції є ізоформами пероксидази, що узгоджується з даними літератури [6, 7]. Встановлено, що найбільшу пероксидазну активність мають фракції № 2, 3.

Таблиця 2 – Розподіл білка і пероксидазної активності в препараті пероксидази хрону

Фракція (Rf)	№ 3 (0,004) Практично на старті	№ 2 (0,015)	№ 1 (0,172)	Неактивна зона білка (0,20–0,26)
Вміст білка, %	37,8±5,29	26,40±4,35	16,60±2,55	19,2±2,85
Пероксидазна активність, %	39,70±2,82	41,90±1,68	18,40±1,19	0,0

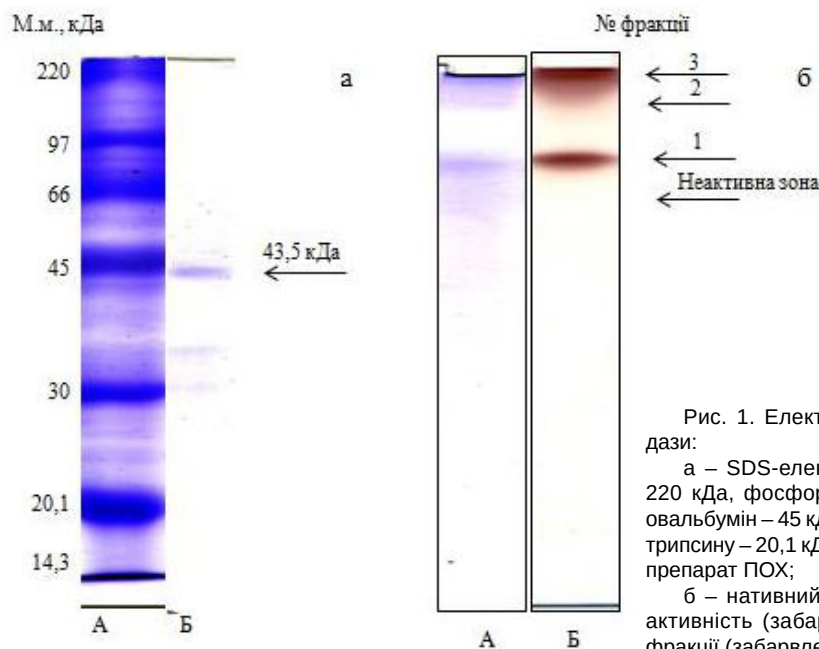


Рис. 1. Електрофореграми препарату пероксидази:

а – SDS-електрофорез, А – маркери: міозин – 220 кДа, фосфорилаза в – 97 кДа, БСА – 66 кДа, овальбумін – 45 кДа, карбоангідраза – 30 кДа, інгібітор трипсину – 20,1 кДа, лізоцим – 14,3 кДа; Б – отриманий препарат ПОХ;

б – нативний електрофорез, А – пероксидазна активність (забарвлення бензидином); Б – білкові фракції (забарвлення Кумасі R-250).

ВИСНОВКИ. Удосконалено спосіб виділення пероксидази з коренів хрону шляхом додавання стадій висолювання білків за допомогою сульфату цинку і міжфазного розділення за допомогою ПЕГ-1500, що сприяли збільшенню

ступеня чистоти ферменту в 37 разів. Методом SDS-електрофорезу підтверджено молекулярну масу ПОХ. З використанням нативного електрофорезу показано, що три білкові фракції (80,8 % загального білка ПОХ) мають пероксидазну активність.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Газарян И. Г. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений / И. Г. Газарян, Д. М. Хушпульян, В. И. Тишков // Успехи биол. химии. – 2006. – **46**, № 2. – С. 303–322.
2. Гаспаров В. С. Определение белка по связыванию с красителем Кумасси бриллиантовым голубым G-250 / В. С. Гаспаров, В. Г. Дегтярев // Биохимия. – 1994. – **59**, № 6. – С. 763–777.
3. Глазова Н. В. Наноструктуры, включающие пероксидазу, антибиотики и циклодекстрины для создания различных фармацевтических композиций / Н. В. Глазова, А. Н. Серкова // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2013. – **13**, № 3. – С. 377–384.
4. Захарова Г. С. Peroxidase из корней хрена: модулирование свойств химической модификацией белковой глобулы и гема / Г. С. Захарова, И. В. Упоров, В. И. Тишков // Успехи биол. химии. – 2011. – **51**, № 2. – С. 37–64.
5. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование / Л. А. Остерман. – М. : Наука, 1981. – 288 с.
6. Shannon L. M. Peroxidase isosymes from horseradish roots / L. M. Shannon, E. Kay, I. J. Lew // J. Biol. Chem. – 1979. – **24**. – P. 2166–2172.
7. Veitch N. C. Horseradish peroxidase: a modern view on a classic enzyme / N. C. Veitch // Phytochemistry. – 2004. – **65**. – P. 249–259.

И. И. Романовская<sup>1</sup>, О. В. Севастьянов<sup>1</sup>, В. А. Топтиков<sup>2</sup>  
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМЕНИ А. В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ<sup>1</sup>, ОДЕССА  
ОДЕССКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. И. МЕЧНИКОВА<sup>2</sup>

## ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА И СВОЙСТВ ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ХРЕНА ПРЕПАРАТА ПЕРОКСИДАЗЫ

### Резюме

Из корней хрена способом осаждения белков сульфатами цинка и аммония, путем использования полимера и диализа выделен препарат пероксидазы (RZ 0,70) с выходом белка 1,7 %, удельной окислительно-восстановительной активностью 7,6 Ед. С применением SDS-электрофореза показано получение частично очищенного препарата пероксидазы с молекулярной массой основной фракции (43±0,5) кДа. Методом нативного электрофореза установлено, что 80,8 % общего белка препарата обладают выраженной пероксидазной активностью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пероксидаза хрена, электрофорез, биохимические свойства.

I. I. Romanovska<sup>1</sup>, O. V. Sevastyanov<sup>1</sup>, V. A. Toptikov<sup>2</sup>  
A. V. BOHATSKYI PHYSICO-CHEMICAL INSTITUTE OF NAS OF UKRAINE<sup>1</sup>, ODESA  
I. I. MECHNYKOV ODESA NATIONAL UNIVERSITY<sup>2</sup>

## INVESTIGATION OF PEROXIDASE PREPARATION COMPOSITION AND PROPERTIES ISOLATED FROM HORSERADISH ROOTS

### Summary

*Using the precipitation of proteins by zinc and ammonium sulfates, then by polymer and subsequent dialysis, the peroxidase preparation from horseradish roots was isolated (RZ=0.7), with yield by protein 1.7 % and specific peroxidative activity 7.6 U. By SDS-electrophoresis method it was verified the obtaining of partially purified peroxidase preparation with molecular mass (43±0.5) kDa. By the native electrophoresis method it was determined, that 80.8 % of the total preparation protein possesses expressed peroxidase activity.*

KEY WORDS: horseradish peroxidase, electrophoresis, biochemical properties.

Отримано 12.10.15

Адреса для листування: I. I. Романовська, Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080, Україна, e-mail: romarina@gmail.com.