

# ФЕРМЕНТЫ: ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

Т. Н. ШЕХОВЦОВА

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

## ENZYMES: THEIR USAGE IN CHEMICAL ANALYSIS

T. N. SHEKHOVTSOVA

*The most important data on enzymes – their properties, structure, mechanism of action – are shortly presented. Spheres for application of enzymatic methods of analysis and their possibilities for the determination of organic and inorganic compounds – substrates and effectors of enzymes – are discussed.*

*Приведены краткие наиболее важные сведения о ферментах – их свойствах, строении, механизме действия. Рассмотрены области применения ферментативных методов анализа, их возможности при определении органических и неорганических соединений – субстратов и эффекторов ферментов.*

## ВВЕДЕНИЕ

Для контроля примесей в объектах пищевой, микробиологической и фармацевтической промышленности, в мониторинге окружающей среды, для решения некоторых медицинских и биохимических задач в последние годы все шире применяют ферментативные методы анализа, основанные на использовании зависимости скорости катализируемой ферментом химической реакции от концентрации реагирующих веществ и фермента. Использование биологических катализаторов, отличающихся высокой активностью и избирательностью действия, позволяет значительно повысить чувствительность и селективность методов анализа. Эти качества в сочетании с простотой аппаратного оформления и методики эксперимента, экспрессностью обосновывают широкое внедрение ферментативных методов в практику клинических, агрохимических, заводских лабораторий, научно-исследовательских институтов, природоохранных служб.

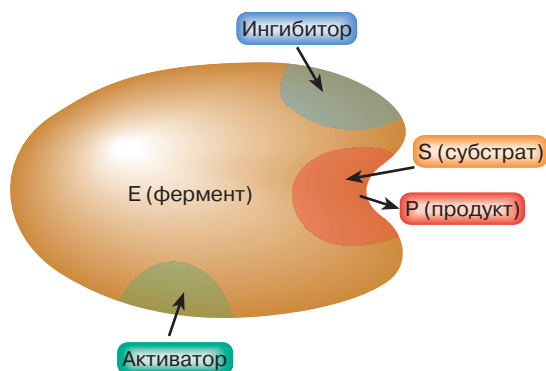
Ферментативными методами можно определять сами ферменты, их субстраты (то есть соединения, превращение которых катализируют ферменты), а также соединения, воздействующие на каталитическую активность ферментов, – их эффекторы, активаторы или ингибиторы (то есть вещества, которые либо повышают, либо понижают активность фермента).

## НЕКОТОРЫЕ ОСНОВНЫЕ СВЕДЕНИЯ О ФЕРМЕНТАХ

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы, ускоряющие химические реакции в живых организмах и вне их. Ферменты обладают уникальными свойствами, которые выделяют их на фоне обычных органических катализаторов гомогенного типа. Прежде всего это необычайно высокая каталитическая активность. Так, добавка незначительной концентрации фермента ( $10^{-9}$ – $10^{-7}$  М) ускоряет превращение субстрата в  $10^8$ – $10^{12}$  раз. Другое, не менее важное свойство ферментов – специфичность (избирательность) их

действия в отношении структуры субстрата, типа реакции и условий ее проведения [1]. Специфичность определяется способностью фермента превращать только данный тип субстратов в определенных реакциях и условиях. Эти свойства ферментов обусловлены сложной структурой макромолекул белка и весьма сложным механизмом их действия [2, 3].

Превращение субстрата происходит на активном центре фермента. Для многих ферментов, состоящих из субъединиц, характерно наличие регуляторного участка, который взаимодействует с веществами, влияющими на активность фермента, – активаторами, ингибиторами или инактиваторами (рис. 1).



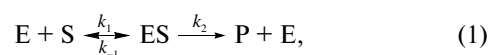
**Рис. 1.** Схематическое изображение взаимодействия фермента с субстратом и эффекторами

Важным свойством ферментов, которое необходимо учитывать при их практическом использовании, является стабильность, то есть способность сохранять каталитическую активность. При хранении и особенно в ходе ферментативной реакции фермент может частично или полностью терять свою каталитическую активность, другими словами, инактивироваться. Одним из эффективных способов стабилизации ферментов является их иммобилизация – перевод в водонерастворимое состояние путем связывания с носителем или модифицирование водорастворимыми полимерами с полным или частичным сохранением ферментами каталитической активности. Повышение стабильности и возможность многократного использования иммобилизованных ферментов значительно повышают экономичность ферментативных методов анализа.

## ВОЗМОЖНОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА

Пределы обнаружения веществ, определяемых ферментативными методами (субстратов, активаторов, об-

ратимых и необратимых ингибиторов и инактиваторов ферментов) зависят не только от каталитической активности фермента, но и от других кинетических характеристик используемой индикаторной реакции [4]. Фермент катализирует реакции, в которых участвуют, как правило, один или два субстрата. Простейшая однострукатная реакция описывается обычно схемой Михаэлиса–Ментен



где E – фермент, S – субстрат, ES – промежуточный комплекс фермента с субстратом (комплекс Михаэлиса–Ментен), P – продукт. При  $[E] \ll [S]_0$  начальная стационарная скорость образования продукта описывается уравнением

$$v_0 = \frac{k_{\text{кат}}[E][S]_0}{K_m + [S]_0}, \quad (2)$$

где  $k_{\text{кат}} = k_2$ ,  $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$ . Согласно уравнению (2), концентрация субстрата  $[S]_0$  будет пропорциональна  $v_0$  только при условии, когда  $[S]_0 \ll K_m$ . Тогда

$$[S]_0 = v_0 K_m / k_{\text{кат}}[E] \quad (3)$$

Следовательно, верхняя граница определяемых концентраций субстрата ограничена величиной константы Михаэлиса–Ментен ( $K_m$ ). Нижняя граница определяемых концентраций субстрата определяется той величиной  $v_0$ , которая может быть зафиксирована с помощью используемого для наблюдения инструментального метода, причем величина  $v_0$  тем выше для одного и того же значения  $[S]_0$ , чем выше  $k_{\text{кат}}$  и  $[E]$ . Таким образом, использование высокоактивного фермента (большое значение  $k_{\text{кат}}$ ) и повышение его концентрации в реакционной смеси могут существенно снизить предел обнаружения субстрата.

Несколько другие кинетические закономерности следует учитывать при определении тех веществ, которые являются эффекторами ферментов. Подробные кинетические уравнения приведены во многих монографиях по ферментативному катализу [1, 4]. Рассмотрим два наиболее типичных примера.

Обратимые неконкурентные ингибиторы, взаимодействуя с ферментом по реакции



где I – ингибитор, а  $K_1 = [EI]/([E] \cdot [I])$ , образуют каталитически неактивные комплексы EI. Можно показать, что в присутствии ингибитора I отношение разности  $[E]_0 - [E] = \Delta[E]/[E]_0$  записывается выражением

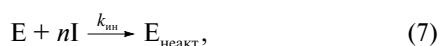
$$\frac{\Delta[E]}{[E]_0} = \frac{K_1[I]}{1 + K_1[I]} \quad (5)$$

При малых значениях  $[I]$ , когда  $K_1[I] \ll 1$ , относительное уменьшение активности фермента будет прямо пропорционально концентрации ингибитора. Тогда

$$[I] = \frac{1}{K_1} \cdot \frac{\Delta[E]}{[E]_0} \quad (6)$$

При высокой концентрации ингибитора, как видно из уравнения (6), точность ее определения уменьшается и, наконец, при  $K_1[I] \gg 1$  отношение  $\Delta[E]/[E]_0$  не зависит от концентрации ингибитора. Следовательно, верхняя граница определяемых концентраций обратимых ингибиторов зависит от величины  $K_1$ . Аналогичные ограничения существуют и при определении обратимых активаторов ферментов.

В случае необратимых ингибиторов или инактиваторов



если значение  $k_{ин}$  достаточно велико, так что временной зависимостью реакции (7) можно пренебречь, уменьшение активности фермента  $\Delta[E]$  будет пропорционально концентрации инактиватора:  $\Delta[E] = n[I]$ , где  $n$  – число молекул инактиватора или ингибитора, взаимодействующих с одной молекулой фермента. Если же величина  $k_{ин}$  относительно мала, то при небольшой глубине протекания реакции ( $\Delta t$  мало, а  $[E]$  мало отличается от  $[E]_0$ ) можно показать, что относительное уменьшение активности фермента  $\Delta[E]/[E]_0 = k_{ин}\Delta t [I]^n$  зависит от длительности процесса активации.

В приведенных примерах рассмотрены реакции, в которых участвует только один фермент, то есть одно-ферментные реакции. В ферментативных методах анализа часто используют сопряженные реакции, катализируемые различными ферментами. При этом продукты первой ферментативной реакции являются субстратами для второй ферментативной реакции и т.д. (Например, пероксид водорода, продукт катализируемой уриказой реакции окисления мочевой кислоты кислородом, является субстратом пероксидазы в реакции окисления аминифеназона и дихлорфенола с образованием красителя. Эта сопряженная система дает возможность определять мочевую кислоту.)

Для контроля начальной скорости ферментативного процесса или концентрации продукта реакции могут быть использованы практически любые доступные исследователю физико-химические методы. Наиболее часто применяют фотометрические методы индикации. При этом в качестве индикаторных часто используют, например, катализируемые пероксидазой и другими оксидазами (ферментами, катализирующими окислительно-восстановительные реакции), а также гидролазами (катализирующими реакции гидролиза) реакции

образования окрашенных продуктов. Исключительно высокой чувствительностью отличаются хемилюминесцентные методы, позволяющие контролировать скорость ферментативных реакций с участием, например, люциферазы. Различные электрохимические методы (потенциометрия, амперометрия) наиболее удобны для контроля скорости реакций, протекающих с поглощением или выделением протонов, а также окислительно-восстановительных процессов, сопровождающихся поглощением кислорода, образованием  $H_2O_2$  и т.д. Ферментные электроды, в которых фермент механически или ковалентно включают в полупроницаемую полимерную мембрану, покрывающую электрод, позволяют специфически определять различные органические и неорганические соединения без введения в анализируемый раствор дополнительных реагентов.

К настоящему времени разработано большое число высокочувствительных и селективных ферментативных методов определения субстратов и эффекторов ферментов: неорганических (ионов металлов, анионов) и органических (N-, S-, P-, O-содержащих) соединений. При этом можно выделить ферменты, позволяющие определять целый класс соединений, либо часть этого класса, либо индивидуальное соединение. Так, с помощью алкогольдегидрогеназы можно определять спирты (субстраты этого фермента), алкогольоксидазы – первичные спирты, арилалкогольоксидазы – ароматические первичные спирты. Следует отметить, что методы определения эффекторов, хотя и менее селективны, часто более чувствительны, чем методы определения субстратов. Так, пределы обнаружения многих органических веществ – субстратов ферментов лежат в интервале  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  М, а органических эффекторов –  $10^{-11}$ – $10^{-8}$  М. Кроме того, число эффекторов ферментов значительно больше, чем число их субстратов, что расширяет возможности ферментативных методов анализа.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Ферментативные методы определения органических соединений успешно разрабатываются и применяются в клинических и биохимических лабораториях. Именно применение ферментов дает возможность селективно определять в крови, моче, тканях и других биологических объектах малые количества таких метаболитов и физиологически активных веществ, как мочевина, мочевая кислота, аминокислоты, сахара (в частности, глюкоза), спирты, липиды, холестерин, нуклеотиды, антибиотики.

Остановимся на некоторых примерах. Ферментативное определение мочевины основано на реакции ее гидролиза, катализируемой ферментом уреазой. Обра-

зующиеся продукты гидролиза – ионы  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{CO}_3^{2-}$  можно определять электрохимически, фотометрически или флуориметрически. Групповое определение аминокислот основано на использовании таких ферментов, как L-амино- или D-аминоксидаза, которые катализируют окисление аминокислоты кислородом воздуха до кетокислоты, пероксида водорода и аммиака. Последний далее определяют электрохимически с помощью  $\text{NH}_3$ -чувствительного газового электрода. Специфическое определение отдельных аминокислот возможно при применении декарбоксилаз, дегидрогеназ, лиаз, трансфераз. Для определения глюкозы используют несколько специфических ферментативных реакций, например: 1) катализируемое глюкозооксидазой окисление ее кислородом воздуха (или другими окислителями) до глюконовой кислоты и пероксида водорода; 2) ее взаимодействие с АТФ с образованием глюкозо-6-фосфата в присутствии гексокиназы. При использовании первой реакции определение глюкозы проводят либо наблюдая за уменьшением количества кислорода в растворе с помощью  $\text{O}_2$ -чувствительного электрода Кларка, либо измеряя pH раствора, который изменяется вследствие образования глюконовой кислоты, либо определяя количество образовавшегося пероксида водорода. Ферментативные методы определения сахарозы и других дисахаридов основаны на использовании специфических ферментов (инвертазы, лактазы), превращающих дисахариды в моносахариды, одним из которых является глюкоза. Далее глюкозу определяют с помощью описанного выше метода. Ферментативное определение этанола основано на использовании одного из двух ферментов: алкогольоксидазы, катализирующей окисление этанола кислородом воздуха до ацетальдегида и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , или алкогольдегидрогеназы, в присутствии которой спирт в реакции с НАД (никотинамидадениндинуклеотидом) превращается в  $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ .

Определение различных токсичных соединений, таких, как фенолы, ароматические амины, фосфор-, сероорганические соединения, является важной задачей аналитической химии и в первую очередь связано с проблемами контроля и охраны окружающей среды.

Некоторые токсичные соединения являются субстратами специфических ферментов, что позволяет значительно упростить подготовку проб сложных по составу объектов анализа. Например, определять мочевины в воде плавательных бассейнов, почве позволяет использование уреазы, для которой мочевины являются высокоспецифическим субстратом.

Однако в большинстве предложенных методов для определения токсичных соединений используют их ингибирующее действие на ферменты. Например, фосфорсодержащие пестициды определяют по ингибированию

холинэстеразы или карбоксилэстеразы; серосодержащие ингибиторы, различные фенолы – с помощью пероксидазы; по ингибированию свечения бактериальной люциферазы определяют инсектициды: ДДТ, пентахлорфенол. Для определения фунгицидов и инсектицидов в плодах, ягодах, листьях применяют папаин, ацетилхолинэстеразу.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Ферментативные методы успешно применяют для чувствительного и селективного определения ионов металлов, неорганических анионов, пероксида водорода, кислорода, растворенного в воде. Многие ионы металлов (например, Ag, Cu, Hg, Zn, Bi, Cd) можно определять с применением ферментов в количествах, недоступных для определения с помощью большинства физико-химических методов анализа. Так, с применением щелочной фосфатазы разработан метод определения нанogramмовых количеств бериллия. По ингибирующему действию на алкогольдегидрогеназу возможно определять ионы серебра в концентрации 10 пг/мл. Предложенные методы определения ртути по ингибирующему действию на пероксидазу и уреазу являются одними из самых чувствительных методов. Важно отметить, что приведенные методы являются не только высокочувствительными, но и селективными. Обычно же методы, основанные на ингибировании или активировании действия ионов металлов на фермент, не отличаются высокой селективностью. Однако избирательность методов можно повысить при использовании обычных для аналитической химии приемов маскирования.

Наиболее чувствительными и селективными являются ферментативные методы определения ионов металлов по реактивации апофермента (белковой части фермента). Так, для определения цинка и кальция использована реактивация апофермента, полученного удалением ионов цинка из щелочной фосфатазы. Чувствительный и селективный метод определения меди основан на реактивации апофермента, полученного диализом иммобилизованной полифенолоксидазы.

Для определения анионов, таких, как  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$ , чаще всего используют ферментные электроды, позволяющие проводить экспрессный анализ сложных промышленных и биологических объектов. Как правило, в ферментных электродах применяют иммобилизованные ферменты. Чаще всего анионы являются субстратами в тех ферментативных реакциях, которые положены в основу методов их определения. Пределы обнаружения анионов при использовании ферментных электродов обычно выше 10 мкМ. Следует особо выделить высокочувствительные методы определения таких физиологически активных анионов,

**Таблица 1.** Примеры использования ферментов для определения их субстратов (I) и ингибиторов (II)

Фермент	Индикаторная реакция	Определяемое вещество		C <sub>n</sub> , М*
		I	II	
Аланиндегидрогеназа	<i>l</i> -Аланин – НАД <sup>+</sup>	<i>l</i> -Аланин		5 · 10 <sup>-6</sup>
Полифенолоксидаза	Фенол – O <sub>2</sub>	Фенол		6 · 10 <sup>-6</sup>
Алкогольоксидаза	Этанол – НАД <sup>+</sup>	Этанол		1 · 10 <sup>-5</sup>
Пероксидаза	Гомованилиновая кислота – H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		5 · 10 <sup>-9</sup>
	Тетрамтилбензидин – H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Hg(II)	1 · 10 <sup>-13</sup>
	<i>o</i> -Дианизидин – H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		CN <sup>-</sup>	8 · 10 <sup>-10</sup>
Сульфитооксидаза	Сульфит – O <sub>2</sub>	SO <sub>2</sub>		1 · 10 <sup>-6</sup>
Холинэстераза	Гидролиз ацетилхолина		Фозалон	5 · 10 <sup>-11</sup>
Уреаза	Гидролиз мочевины	Мочевина		1 · 10 <sup>-6</sup>
			Cd (II)	1 · 10 <sup>-8</sup>
Щелочная фосфатаза	Гидролиз <i>n</i> -НТФ ( <i>n</i> -нитрофенилфосфат)		Тиокрезол	8 · 10 <sup>-8</sup>
			Pb(II)	2 · 10 <sup>-12</sup>
Кислая фосфатаза	Гидролиз <i>n</i> -НТФ		F <sup>-</sup>	1 · 10 <sup>-10</sup>

\* C<sub>n</sub> – нижняя граница определяемых концентраций.

как CN<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, S<sup>2-</sup>, F<sup>-</sup>, основанные на их реактивирующем действии на инвертазу, ингибированную ртутью или серебром (с пределами обнаружения 0,2–10 нг/мл), а также на ингибирующем действии на пероксидазу и кислую фосфатазу.

Определение других неорганических соединений – аммиака, кислорода, диоксида серы, пероксида водорода основано на том, что они являются субстратами многих ферментов и, следовательно, могут быть определены с их помощью. Особенно широко применяют методы определения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с применением пероксидазы; аскорбатоксидазу, люциферазу используют для определения микроколичеств кислорода.

В табл. 1 приведены некоторые наиболее интересные примеры методов определения органических и неорганических соединений: субстратов и ингибиторов различных ферментов.

В заключение следует отметить, что области применения ферментативных методов постоянно расширяются. Несомненно основным остается использование ферментов в клиническом анализе. В последние годы более активно стали разрабатываться методы ферментативного анализа пищевых продуктов, фармацевтических препаратов, объектов окружающей среды, непрерывного контроля микробиологических и биохимических процессов в производстве.

Расширению применения ферментов в аналитической химии способствуют дальнейшее развитие энзимологии, разработка новых способов стабилизации ферментов, выделение и исследование новых ферментов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. Т. 1. 389 с.
2. Ферит Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980. Т. 1. 432 с.
3. Клячко Н.Л. Ферменты – биологические катализаторы: Основные принципы действия // Соросовский Образовательный Журнал. 1997. № 3. С. 58–63.
4. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990. 350 с.

### Рецензенты статьи

О.М. Полторац, С.Д. Варфоломеев, Г.В. Лисичкин

\* \* \*

Татьяна Николаевна Шеховцова, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии химического факультета МГУ. Область научных интересов – развитие теоретических основ и практическое применение ферментативных методов в химическом анализе. Автор более 150 научных публикаций.