

*На правах рукописи*

Бычков Павел Валерьевич

**СРАВНЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКИХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ  
АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗ  
РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ  
ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ИХ ИНГИБИТОРОВ И КОФАКТОРА**

**02.00.02 - Аналитическая химия**

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва - 2004

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета  
Московской государственного университета им. М.В. Ломоносова

Научный руководитель: доктор химических наук,  
профессор Шеховцова Татьяна Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,  
профессор Градова Нина Борисовна

кандидат химических наук,  
старший научный сотрудник  
Бузланова Маргарита Михайловна

Ведущая организация:  
Казанский государственный университет, химический факультет

**Защита состоится 23 декабря 2004 г. в 16 ч 10 мин в аудитории 344 на заседании диссертационного совета Д.501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу:  
119992, Москва, Ленинские горы, МГУ, химический факультет.**

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан            ноября 2004 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук



Торочешникова И.И.

## ВВЕДЕНИЕ

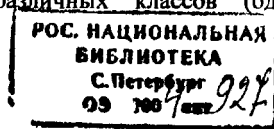
**Актуальность.** Сочетание высокой чувствительности и селективности ферментативных методов анализа с экспрессностью и простотой их аппаратного оформления и методики эксперимента обуславливает все более активное привлечение этих методов для решения задач мониторинга окружающей среды и определения ультрамалых количеств веществ в разных отраслях промышленности, медицине и биохимии.

Исследования, проведенные на кафедре аналитической химии МГУ, наглядно показали, что перспективным приемом направленного изменения метрологических характеристик ферментативных методов определения неорганических и органических веществ, а также расширения круга применяемых для этой цели биокатализаторов является использование препаратов одних и тех же ферментов, выделенных из разных источников. Различная чувствительность таких препаратов ферментов к действию одних и тех же эффекторов позволяет разрабатывать методики их определения с отличающимися аналитическими характеристиками и, следовательно, целенаправленно выбирать определенные препараты ферментов для решения конкретных задач.

Вышесказанное свидетельствует об **актуальности настоящего исследования, целью** которого является сопоставление возможностей использования алкогольдегидрогеназ, выделенных из различных источников - печени лошади и пекарских дрожжей, в химическом анализе для определения их неорганических и органических ингибиторов и металла-кофактора -  $Zn(II)$

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

- исследовано влияние на каталитическую активность алкогольдегидрогеназы (АДГ) из печени лошади неорганических (ионов тяжелых металлов) и металлоорганических (метилпроизводных ртути и олова) соединений,
- изучено действие на активность алкогольдегидрогеназы из печени лошади органических соединений различных классов (одно- и



- двухосновных насыщенных неразветвленных карбоновых кислот, аминокислот и азотсодержащих гетероциклических соединений;
- с целью разработки методики определения кофактора (Zn(II)) изучена возможность получения апо-АДГ из печени лошади и ее реактивации ионами металла-кофактора и других металлов;
  - на основе сравнительного анализа полученных результатов и литературных данных о влиянии тех же соединений на каталитическую активность АДГ из пекарских дрожжей выявлены ингибиторы, для определения которых целесообразно использовать алкогольдегидрогеназу из одного или другого источника.

**Научная новизна** заключается в том, что

- установлены степени и тип ингибирующего действия на каталитическую активность АДГ из печени лошади ряда ионов тяжелых металлов, в частности **Hg(II), Ag(I), Zn(II) и Sn(IV)**;
- выявлено ингибирующее влияние на АДГ из печени лошади металлоорганических соединений - метилпроизводных ртути(II) и олова(IV); показано, что ингибирование АДГ из печени лошади ртуть- и оловоорганическими соединениями реализуется по аналогичному типу;
- установлено, что высшие одно- и двухосновные карбоновые кислоты ингибируют только АДГ из печени лошади; а низшие жирные кислоты ингибируют (по полностью конкурентному типу) активность обеих АДГ;
- показано ингибирующее действие на АДГ из печени лошади ряда аминокислот (гистидина, триптофана, пролина, цистеина), а также азотсодержащих гетероциклических соединений (1,10-фенантролина, 1,2,3-бензотриазола, 2,6-дипиколиновой кислоты и 2,2'-дипиридила);
- на примере ионов ртути(II), метилртути и триптофана продемонстрирована идентичность механизмов действия ионов металлов, металлоорганических соединений и аминокислот на активность алкогольдегидрогеназ, выделенных из печени лошади и пекарских дрожжей;

- на примере определения ряда наиболее эффективных ингибиторов фермента (некоторых жирных кислот, ионов металлов, аминокислот, азотсодержащих гетероциклических соединений) показана целесообразность применения алкогольдегидрогеназы из печени лошади в химическом анализе;
- изучена возможность получения апо-алкогольдегидрогеназы из печени лошади с использованием различных комплексообразующих реагентов и ее реактивации ионами металлов;
- высказаны предположения о структурных особенностях АДГ, выделенных из различных источников, обусловивших их разную чувствительность к действию одних и тех же ингибиторов.

**Практическую значимость** имеют разработанные на основе ингибирующего действия на АДГ из печени лошади методики определения

- ртути(II) и цинка(II) в водах на уровне ПДК ( $c_n = 0.05$  мкг/мл,  $s_r = 0.02$ );
- метилртути ( $c_n = 1$  мкМ,  $s_r = 0.03$ );
- аминокислот - пролина, триптофана, гистидина ( $c_n = 0.01$  мМ,  $s_r = 0.06$ , 0.05 и 0.06 соответственно);
- 1,2,3-бензотриазола ( $c_n = 0.5$  мкМ,  $s_r = 0.03$ ) и 2,6-дипиколиновой кислоты ( $c_n = 1$  мкМ,  $s_r = 0.05$ );
- жирных кислот: одноосновных - пропионовой ( $c_n = 0.5$  мМ,  $s_r = 0.01$ ), масляной ( $c_n = 0.7$  мМ,  $s_r = 0.02$ ), валериановой ( $c_n = 0.05$  мМ,  $s_r = 0.02$ ), капроновой ( $c_n = 0.05$  мМ,  $s_r = 0.03$ ), пеларгоновой ( $c_n = 0.01$  мМ,  $s_r = 0.02$ ), каприновой ( $c_n = 5$  мкМ,  $s_r = 0.03$ ), и двухосновных - янтарной ( $c_n = 0.1$  мМ,  $s_r = 0.02$ ), глутаровой ( $c_n = 0.05$  мМ,  $s_r = 0.03$ ), себаценовой ( $c_n = 1$  мкМ,  $s_r = 0.03$ ).

**Автор выносит на защиту:**

- результаты изучения влияния на каталитическую активность АДГ из печени лошади в реакции окисления этанола никотинамидадениндинуклеотидом различных неорганических и металлоорганических

соединений с целью разработки методик определения наиболее эффективных ингибиторов, для получения сведений о различиях в доступности сульфгидрильных групп ферментов, выделенных из различных источников - печени лошади и пекарских дрожжей;

- результаты исследования влияния различных жирных кислот и аминокислот на активность АДГ из печени лошади, обосновывающие целесообразность применения этого фермента в химическом анализе;
- результаты изучения влияния на активность АДГ из печени лошади различных азотсодержащих гетероциклических соединений, демонстрирующие различную доступность и химическую форму металла-кофактора двух алкогольдегидрогеназ;
- данные о получении и реактивации апофермента АДГ из печени лошади, характеризующие значительно большую доступность т.н. структурного цинка в молекуле этого фермента по сравнению с АДГ из пекарских дрожжей;
- сравнительный анализ возможностей использования алкогольдегидрогеназ, выделенных из печени лошади и пекарских дрожжей, для определения различных неорганических и органических соединений.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на VII Всероссийской конференции "Органические реагенты в аналитической химии" (Саратов, 1999), Всероссийской конференции "Химический анализ веществ и материалов" (Москва, 2000), VII Международном симпозиуме "Kinetics in Analytical Chemistry" (Румыния, 2001), Конференции молодых ученых "Ломоносов-2002", Международной конференции "Biocatalysis. Fundamentals and Application" (Москва, 2002), Международном форуме "Аналитика и аналитики" (Воронеж, 2003), Международном симпозиуме "Euroanalysis XIII" (Испания, 2004).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 2 статьи и 7 тезисов докладов.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа изложена на 237 стр. машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы (главы 1—3), экспериментальной части (главы 4-9), заключения, выводов, списка литературы, включающего 231 наименование, и приложения; содержит 63 рисунка, 50 таблиц, 11 схем.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Обзор литературы

В первой главе систематизированы данные о структуре, субстратной специфичности, коферментной функции и механизме действия алкогольдегидрогеназы из печени лошади и сопоставлены с аналогичными данными, касающимися фермента из пекарских дрожжей. Вторая глава посвящена сравнительному анализу сведений об эффекторах двух алкогольдегидрогеназ, механизме их влияния и методах определения. Обзор способов получения и реактивации различных апоферментов, в том числе и апо-алкогольдегидрогеназ различного происхождения, представлен в третьей главе.

### Экспериментальная часть

В работе использованы препараты алкогольдегидрогеназы (АДГ) из печени лошади фирм "Fluka AG" (Швейцария) и "Sigma" (США) с удельной активностью 0.51 ед/мг и 0.52 ед/мг соответственно, а также АДГ из пекарских дрожжей ("Sigma", США) с удельной активностью 500 ед/мг и препарат  $\beta$ -никотинамидадениндинуклеотида (НАД<sup>+</sup>), выделенного из дрожжей ("Sigma", США). Для отбора малых объемов растворов ( $\leq 1$  мл) использовали микродозаторы фирмы "Biohit" (Финляндия). Начальную скорость индикаторной реакции контролировали спектрофотометрически и характеризовали тангенсом угла наклона ( $\text{tg}\alpha$ ) начальных линейных участков кинетических кривых в координатах оптическая плотность — время. Начальную скорость ферментативной реакции ( $V_0$ , мкМ/мин) рассчитывали по формуле:

$V_0 = \text{tga} / \varepsilon \cdot l$ , где  $\varepsilon$  — коэффициент молярного поглощения НАДН,  $l$  — длина оптического пути. Степень ингибирования (I,%) рассчитывали по формуле:

$I = 100 \cdot (V_0 - V_{\text{Ing}}) / V_0$ , где  $V_0$  и  $V_{\text{Ing}}$  — скорость индикаторной реакции в отсутствие и в присутствии ингибитора соответственно. Степень реактивации (A,%) рассчитывали по формуле:  $A = 100 \cdot (V_{\text{Me}} - V_L) / (V_0 - V_L)$ , где  $V_0$  — скорость индикаторной реакции в отсутствие комплексообразующего агента (лиганда) и иона металла,  $V_L$  — в присутствии лиганда,  $V_{\text{Me}}$  — в присутствии лиганда и иона металла. Оптическую плотность всех растворов измеряли при помощи фотоэлектроколориметра КФК-2 и спектрофотометра Shimadzu UV-2201 ("Shimadzu", Япония). Все измерения проводили при комнатной температуре без термостатирования, поскольку ранее было выяснено, что при повышении температуры на 10°C скорость реакции изменяется не более чем на 2%.

#### **Обоснование выбора фермента и индикаторной реакции; оптимизация условий ее проведения**

Ранее в лаборатории кинетических методов анализа кафедры аналитической химии МГУ показано, что для создания чувствительных методик определения соединений, имеющих большое сродство к сульфгидрильным группам белка, а также азотсодержащих гетероциклических соединений весьма перспективно использование алкогольдегидрогеназы из пекарских дрожжей. Была получена апоформа этого фермента и разработана чувствительная методика определения кофактора — иона цинка(II) по реактивации апофермента.

Известно, что АДГ выделяют из различных источников; помимо фермента из пекарских дрожжей, доступным коммерческим препаратом является АДГ из печени лошади, также содержащая 2 иона цинка на субъединицу белка, имеющая очень близкое по составу окружение металлокофактора и катализирующая окисление того же субстрата по одному общему механизму. В то же время АДГ из печени лошади проявляет существенно более широкую субстратную специфичность и, что особенно важно, подвержена



ингибирующему воздействию более широкого круга различных веществ. При этом алкогольдегидрогеназа из печени лошади в целях химического анализа до настоящего времени не использовалась. Все эти сведения явились основанием для постановки исследования, направленного на выявление и определение эффекторов АДГ, выделенной из печени лошади, и сопоставление полученных экспериментальных данных с известными данными об АДГ из пекарских дрожжей. Совокупность полученных и имевшихся ранее сведений должна позволить обоснованно подходить к выбору определенного ферментного препарата для решения конкретных аналитических задач.

В качестве индикаторной нами была выбрана реакция окисления этанола никотинамидадениндинуклеотидом (НАД<sup>+</sup>). Выбор обусловлен тем, что именно в этой реакции АДГ проявляет максимальную каталитическую активность и с использованием данной реакции в большинстве работ изучено влияние различных соединений на каталитическую активность алкогольдегидрогеназ. Кроме того, эта же реакция была использована в исследованиях с АДГ из пекарских дрожжей, т.е. выбор и изучение нами указанной реакции должны обеспечить наиболее полное и корректное сопоставление свойств и аналитических возможностей алкогольдегидрогеназ из разных источников.

Установлены оптимальные условия проведения индикаторной реакции в присутствии АДГ из печени лошади: рН 9.5, трис-НС1-буферный раствор, концентрации в реакционной смеси: АДГ - 4 мкМ, НАД<sup>+</sup> — 0.6 мМ, этанола — 0.03 М.

### **Влияние ионов тяжелых металлов на каталитическую активность АДГ из печени лошади**

Ионы тяжелых металлов относятся к потенциально опасным токсикантам и являются эффективными ингибиторами многих ферментов; при этом их влияние чаще всего объясняют нарушением выгодной для катализа геометрии биокатализатора при взаимодействии с его SH-группами. В связи с этим нами было изучено влияние на каталитическую активность АДГ из печени лошади ионов металлов, способных взаимодействовать с сульфгидрильными группами

белка, а также имеющих близкие к металлу-кофактору - цинку(II) ионные радиусы (табл.1). Показано, что Hg(II), Ag(I), Zn(II) и Sn(IV) в концентрации 1 мкг/мл проявляют значительное ингибирующее действие на фермент, Cu(II), Co(II), Pb(II) и Sn(II) ингибируют АДГ весьма незначительно ( $I \leq 7\%$ ) даже при концентрации 10 мкг/мл, а никель(II) и железо(III) не влияют на активность АДГ даже при их концентрации 100 мкг/мл. При совместном инкубировании с ферментом усиливается действие только ионов металла-кофактора, что может быть объяснено абсорбцией цинка(II) белковой глобулой фермента.

**Таблица 1.** Характеристики ингибирующего действия ионов тяжелых металлов на каталитическую активность алкогольдегидрогеназ, выделенных из печени лошади (I) и пекарских дрожжей (II).

Ион металла	Диапазон концентраций, в котором проявляется ингибирующее действие, мкг/мл		$\tau_{\text{инк}}$ мин		Диапазон определяемых концентраций, мкг/мл		$s_r$ (при $s_H$ , $n=3$ )	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Hg(II)	0.01–1.0	$1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-2}$	0	0	0.05–1.0	$5 \cdot 10^{-5}$ – $5 \cdot 10^{-4}$	0.02	0.02
Ag(I)	0.05–10	$1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-3}$	0	5	0.1–1.0	$8 \cdot 10^{-5}$ – $5 \cdot 10^{-3}$	0.04	0.02
Zn(II)	0.1–1.0	$1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-1}$	5	5	0.05–1.0	$5 \cdot 10^{-3}$ – $5 \cdot 10^{-2}$	0.03	0.05
Cu(II)	0.1–100	0.01–1.0	0	0	—*	0.1–1.0	—	0.09
Sn(IV)	1–100	Не изучено	0	н/и	1.0–10.0	Не изучено	0.06	н/и
Pb(II)	10–100	$1 \cdot 10^{-6}$ – $5 \cdot 10^{-3}$	0	15	—	—	—	—

\* \_отсутствует линейная зависимость скорости реакции от концентрации ингибитора

Эффективность ингибирующего действия ионов металлов на АДГ из печени лошади убывает в ряду: Hg(II)>Ag(I)>Zn(II)>Sn(IV)>Cu(II)>Pb(II), что, в основном, коррелирует с полученными ранее данными по их влиянию на АДГ из другого источника: Hg(II)>Ag(I)>Pb(II)>Zn(II)>Cu(II). При этом все тяжелые металлы в большей степени ингибируют АДГ из пекарских дрожжей (табл.1). Справедливости ради следует упомянуть о значительном различии в удельной

активности коммерческих препаратов АДГ, которая может приводить к столь разительному отличию концентраций ингибиторов. Наиболее эффективными ингибиторами обеих алкогольдегидрогеназ являются ионы ртути(II) и серебра, что обусловлено, очевидно, наибольшим сродством этих ионов к сульфгидрильным группам белка.

Разработаны методики определения ионов тяжелых металлов по их ингибирующему действию на АДГ из печени лошади (табл.1), уступающие по аналитическим характеристикам аналогичным методикам с использованием АДГ из пекарских дрожжей. Тем не менее, предложенные нами методики определения ртути(II) и цинка(II) могут найти применение при анализе вод на содержание этих ионов при их концентрациях на уровне ПДК.

На примере наиболее эффективного ингибитора обеих АДГ — ионов ртути - показано, что ингибирующее действие ионов тяжелых металлов на каталитическую активность двух АДГ осуществляется по одному и тому же, смешанному, типу. В то же время значительные различия в диапазонах концентраций ионов металлов, в которых они ингибируют различные АДГ и могут быть определены с их использованием, свидетельствуют о различной доступности сульфгидрильных групп в их молекулах.

### **Влияние на каталитическую активность алкогольдегидрогеназы из печени лошади металлоорганических соединений**

Органические производные тяжелых металлов представляют особую опасность для человека и животных в силу их большего, чем у соответствующих неорганических солей токсичного действия. Нами изучен характер действия на активность АДГ из печени лошади наиболее токсичных представителей этого класса. Установлено, что метилртуть так же, как и Hg(II), оказывает значительное ингибирующее действие на фермент, которое, однако, проявляется при более высоких концентрациях (1-100 мкМ), чем в случае АДГ из дрожжей (1 нМ - 10 мкМ). Ингибирование метилртутью ( $\text{MeHg}^+$ ) обеих АДГ осуществляется по одному и тому же, бесконкурентному, типу. Разработана методика определения метилртути в диапазоне концентраций 1-10 мкМ;

уравнение градуировочного графика имеет вид  $y = 67.8 - 0.38x$  ( $c_{\text{мин}} = 0.6$  мкМ,  $s_r = 0.03$ ,  $n=3$ ,  $P=0.95$ ), где  $y - V_0$ , мкМ/мин,  $x$  — концентрация  $\text{MeHg}^+$  ( $C \cdot 10^6$ , М).

Выявлено, что соотношение степеней ингибирования АДГ из печени лошади метилпроизводными олова и ртути коррелирует с таковыми для неорганических ионов этих металлов, т.е. моно-, ди- и триметилолово являются существенно менее эффективными ингибиторами АДГ, чем  $\text{MeHg}^+$ . При этом степень ингибирования фермента в их присутствии возрастает в ряду  $\text{Me}_3\text{Sn}^+ < \text{Me}_2\text{Sn}^{2+} < \text{MeSn}^{3+}$  ( $I = 20, 40$  и  $53\%$  соответственно при концентрации ингибиторов 1 мМ). Так как оловоорганические соединения обладают, по литературным данным, ярко выраженной окислительной способностью, возрастающей в том же ряду, их ингибирующий эффект обусловлен, очевидно, взаимодействием олова с SH-группами фермента и последующим окислением этих групп по связи Sn-S.

Нами показано, что тип ингибирующего действия метилолова и метилртути идентичен (бесконкурентный). Тот факт, что соединения ртути(II), как органические, так и неорганические, являются более сильными ингибиторами АДГ, чем соединения олова(IV), может определяться, главным образом, способностью иона металла взаимодействовать с SH-группами АДГ.

### **Влияние органических соединений на каталитическую активность алкогольдегидрогеназы из печени лошади**

С целью выявления эффективных органических ингибиторов алкогольдегидрогеназы из печени лошади изучено влияние на ее активность широкого круга органических соединений различных классов. Особый интерес представляло *изучение влияния жирных кислот*, поскольку их действие упомянуто в литературе только в случае АДГ из печени лошади, а число методов их определения крайне мало. В связи с этим было изучено влияние на каталитическую активность фермента одно- и двухосновных насыщенных карбоновых неразветвленных кислот. Оказалось, что энантовая, каприловая, пальмитиновая, стеариновая и никотиновая кислоты фактически не влияют на

каталитическую активность фермента, в то время как степень влияния остальных кислот четко коррелирует с их строением, а именно с длиной углеродной цепи. При этом ингибирующий эффект одних жирных кислот усиливается при их инкубировании с ферментом, а других — остается неизменным (табл.2).

**Таблица 2.** Характеристики ингибирующего действия жирных кислот на каталитическую активность алкогольдегидрогеназы из печени лошади

Жирные кислоты	Диапазон концентраций, в котором проявляется ингибирующее действие, мМ	$\tau_{\text{инк}}$ , мин	Диапазон определяемых концентраций, мМ	$s_r$ (при $c_H$ $n=3$ )	$C_{\text{min}}$ , мМ
Пропионовая	0.1 – 10	5	0.5 – 10	0.01	1
Масляная	0.5 – 10	0	0.75 – 10	0.02	4
Валериановая	0.01 – 1.0	30	0.05 – 5	0.02	0.02
	* 0.05 – 5.0	30	0.1 – 1	0.03	0.6
Капроновая	0.001 – 1.0	15	0.05 – 1	0.03	0.02
Пеларгоновая	0.005 – 1.0	0	0.01 – 1	0.02	0.02
Каприновая	0.001 – 1.0	5	0.005 – 0.5	0.03	0.001
Янтарная	0.05 – 1.0	5	0.1 – 10	0.02	0.005
Глутаровая	0.001 – 5.0	5	0.05 – 1	0.03	0.02
Себациновая	0.0005 – 1.0	0	0.001 – 0.5	0.03	0.0006

\* - с использованием АДГ из пекарских дрожжей

Причины различного поведения жирных кислот разного строения становятся понятными при рассмотрении изменения характера межмолекулярных взаимодействий в ряду одноосновных неразветвленных карбоновых кислот с ростом углеродной цепи. В начале ряда, когда алкильные группы еще малы, преобладают гидрофильные взаимодействия; именно такие кислоты ( $C_3$ - $C_6$ ), сильно поляризованные в воде, конкурируют со спиртом в индикаторной реакции, понижая активность фермента. Когда алкильные группы содержат 6-7 атомов углерода, гидрофобные взаимодействия имеют

место наряду с гидрофильными (и те, и другие слабо выражены и равны по силе); такие кислоты ( $C_7$ - $C_8$ ) уже не способны эффективно конкурировать со спиртом, вследствие чего ингибирующий эффект незначителен. При наличии 9-11 атомов углерода в цепи преобладают гидрофобные взаимодействия; кислоты ( $C_9$ - $C_{11}$ ) атакуют не субстрат-связывающий центр АДГ, а гидрофобный центр комплекса **{АДГ-НАД<sup>+</sup>}** (сродство к которому повышается с ростом углеродной цепи), что также ведет к ингибированию активности фермента. При дальнейшем росте алкильной группы возрастают стерические затруднения, приводящие к тому, что уже маргариновая и стеариновая ( $C_{15}$ - $C_{16}$ ) кислоты не ингибируют АДГ. Замена неразветвленной алкильной группы на разветвленную или ароматическую значительно усиливает стерические затруднения, препятствующие подходу кислоты как к субстрат-связывающему, так и гидрофобному центру, что было показано на примере никотиновой кислоты.

Важным дополнением к сказанному выше является тот факт, что кислоты, конкурирующие со спиртом за связывание с ферментом и образующие двойные комплексы, по всей видимости, не координируются с металлом-кофактором, т.е. объектом атаки  $COOH$ - групп становится Ser-48. Таким образом, низшие карбоновые кислоты связывают остаток Ser-48, дестабилизируя систему водородных связей между ферментом, коферментом и субстратом и препятствуя присоединению последних к биокатализатору. Ингибирующее действие карбоновых кислот с 7-8 метиленовыми группами реализуется по иному принципу. Эти кислоты имеют объемную алкильную группу, резко ограничивающую возможность образования связи с Ser-48, и, как следствие, двойного комплекса {фермент-ингибитор}. Однако размер гидрофобного хвоста молекул этих кислот позволяет проникнуть к олеофильному центру комплекса **{фермент-кофермент}** и образовать тройной комплекс **{фермент-кофермент-кислота}**. Очевидно, такой механизм взаимодействия ингибитора с ферментом обеспечивает наибольшее искажение структуры биокатализатора, т.е. способствует максимальному ингибированию

активности фермента. На примере масляной кислоты установлено, что низшие карбоновые кислоты ингибируют фермент по полностью конкурентному типу. Это подтверждает различия в механизмах действия низших и высших карбоновых кислот и объясняет тот факт, что кислоты, присоединяющиеся к гидрофобному центру комплекса {АДГ-НАД<sup>+</sup>}, — более эффективные ингибиторы по сравнению с теми кислотами, которые присоединяются к субстрат-связывающему центру фермента.

Разработаны методики определения ряда жирных кислот (табл.2). Показана принципиальная возможность селективного определения жирных кислот — эффективных ингибиторов, на фоне кислот, не влияющих на активность АДГ: так, энантовая кислота не мешает определению 1 мМ масляной кислоты при соизмеримом и 10-кратном количествах. Методика определения янтарной кислоты применена для анализа на ее содержание лекарственных трав — зверобоя и шалфея. Полученные нами данные: **(5.3±0.2)** и **(4.9±0.4)** % от массы сухого сырья соответственно (**n=3, P=0.95**) согласуются с результатами определения этого вещества методом ионо-эксклюзионной хроматографии (5.2 и 5.6% соответственно), что свидетельствует о возможности применения разработанной нами методики для анализа реальных объектов на содержание жирных кислот.

Нами изучено влияние наиболее эффективных ингибиторов АДГ из печени лошади — валериановой, каприновой и себациновой кислот, на каталитическую активность АДГ из дрожжей (ранее влияние жирных кислот на этот фермент изучено не было) Показано, что каприновая и себациновая кислоты практически не влияют на активность АДГ из дрожжей, а валериановая кислота оказывает сопоставимое по степени ингибирующее действие на обе АДГ (табл.3). Разработанная нами методика определения валериановой кислоты по ее ингибирующему действию на АДГ из пекарских дрожжей уступает по пределу обнаружения методике с применением АДГ из печени лошади (табл.2).

Известно, что в биологических системах Zn(II) образует предпочтительно связь с донорными атомами азота и серы. Это справедливо и в случае алкогольдегидрогеназ из разных источников, что подтверждается наличием выраженного ингибирующего эффекта ионов цинка на их активность. С целью выбора реагента для получения апофермента АДГ из печени лошади выяснили возможность связывания металла-кофактора с атомами азота и серы, присутствующими в структуре введенных извне азотсодержащих гетероциклических соединений, в том числе аминокислот.

**Таблица 3.** Влияние жирных кислот на каталитическую активность алкогольдегидрогеназ из печени лошади (I) и пекарских дрожжей (II).

Жирная кислота (0.1 мМ)	Степень ингибирования (1,%) жирными кислотами	
	I	II
Себациновая	45%	8%
Каприновая	25%	4%
Валериановая	15%	16%

Показано, что те родственные активному центру АДГ *аминокислоты*, которые являются наиболее эффективными ингибиторами фермента из дрожжей, проявляют сопоставимое по степени ингибирующее действие на алкогольдегидрогеназу из печени лошади. На примере триптофана установлено, что аминокислоты ингибируют АДГ, выделенные из различных источников, по одному и тому же, смешанному типу, что свидетельствует в пользу наличия у них общих свойств принципиального характера, и, прежде всего, аналогичного аминокислотного состава субстрат-связывающего кармана.

Разработанные методики определения аминокислот с использованием АДГ из печени лошади отличаются большей экспрессностью и более высокой воспроизводимостью по сравнению с аналогичными методиками с использованием фермента из дрожжей (табл.4).



Таблица 4. Сравнение характеристик ферментативных методик определения аминокислот с использованием алкогольдегидрогеназ из печени лошади (I) и пекарских дрожжей (II).

Соединение	$\tau_{\text{инк}}$ , мин		Диапазон определяемых концентраций, мМ		$s_r$ (n=3)		$C_{\text{мин}}$ , мкМ	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Гистидин	5	30	0.01 – 0.10		0.06	0.09	7	3
Триптофан	0	15			0.05	0.09	5	4
Пролин	5	15			0.06	0.10	5	5

Аминокислоты - ингибиторы АДГ содержат гетероциклический атом азота, поэтому было подробно изучено *влияние гетероциклических азотсодержащих соединений*. Установлено, что наибольшее ингибирующее действие на АДГ из печени лошади оказывают 1,10-фенантролин, 2,6-дипиколиновая кислота, 1,2,3-бензотриазол и 2,2'-дипиридил. При этом влияние этих веществ наиболее четко выражено при pH 9.5, в то же время существенно менее эффективные ингибиторы АДГ из печени лошади - ЭДТА и 8-гидроксихинолин, в максимальной степени понижают активность фермента при pH 8.0. Пиридин,  $\alpha$ -пиколин и хинолин не изменяют каталитическую активность фермента.

Ингибирующий эффект 1.10-фенантролина и 2,2'-дипиридила практически не зависит от времени их выдерживания с ферментом, в то время как наибольшая степень ингибирующего действия ЭДТА, 8-гидроксихинолина, 2,6-дипиколиновой кислоты и 1,2,3-бензотриазола достигается при их 30-, 30-, 15- и 5-минутном инкубировании с ферментом соответственно. При этом азотсодержащие соединения в меньшей степени ингибируют АДГ из печени лошади, чем фермент из дрожжей (табл.5), что, очевидно, указывает на большую доступность иона металла-кофактора для действия этих реагентов в случае второго фермента. Сопоставление степеней ингибирования АДГ из печени лошади 1,2,3-бензотриазолом и 1,10-фенантролином, а также

конкурентный тип ингибирования последним, свидетельствуют о том, что азотсодержащие соединения, как и жирные кислоты, взаимодействующие с двойным комплексом {АДГ-НАД<sup>+</sup>}, оказываются более эффективными ингибиторами фермента, чем конкурирующие со спиртом.

**Таблица 5.** Степени ингибирующего действия азотсодержащих гетероциклических соединений (при их концентрации 1мМ) на каталитическую активность АДГ из печени лошади (I) и пекарских дрожжей (II).

Азотсодержащее соединение	Степень ингибирования, %	
	I	II
1,10-Фенантролин	63	73
1,2,3 -Бензотриазол	40	38
2,2'-Дипиридил	26	33
2,6-Дипиколиновая кислота	23	—*
ЭДТА	10	8

\* - влияние не изучено.

На примере изученных азотсодержащих гетероциклических соединений и аминокислот, имеющих в составе донорный гетероциклический атом азота, показано, что наиболее вероятным механизмом ингибирования АДГ такими веществами является их взаимодействие с каталитическим ионом цинка(II). В связи с этим степень ингибирования АДГ азотсодержащими соединениями должна убывать в ряду пониженияустойчивости их комплексов с Zn(II). В действительности же, необходимо учитывать стерический фактор, который играет более важную роль для проявления ингибирующего действия органических соединений на фермент, выделенный из печени лошади.

Таким образом, нами показана целесообразность использования АДГ из печени лошади в химическом анализе для определения некоторых ее ингибиторов, относящихся к классам насыщенных неразветвленных одно- и двухосновных карбоновых кислот, ряда аминокислот, а также азотсодержащих гетероциклических соединений, содержащих шестичленные циклы (табл.6).

При сопоставлении полученных нами данных с результатами изучения АДГ из дрожжей выявлены некоторые принципиальные различия в механизмах катализа алкогольдегидрогеназами, выделенными из различных источников.

**Таблица 6.** Сравнение характеристик ферментативных методик определения азотсодержащих соединений с использованием алкогольдегидрогеназ из печени лошади (I) и пекарских дрожжей (II).

Соединение	Диапазон определяемых концентраций, М		$s_r$ (при $s_{\text{н}}$ , $n=3$ )		$C_{\text{мин}}$ , М	
	I	II	I	II	I	II
1,2,3-Бензотриазол	$5 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	0.03	0.06	$1 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-7}$
1,10-Фенантролин	$5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-8}$	0.02	0.05	$3 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-10}$
2,2'-Дипиридил	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-5}$	0.05	0.08	$9 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$
2,6-Дипиколиновая кислота	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	—*	0.05	—	$8 \cdot 10^{-6}$	—

\* — влияние не изучено

### Получение апофермента алкогольдегидрогеназы из печени лошади и его реактивация ионами цинка и кобальта

Перспективным приемом повышения селективности ферментативных методов определения металлов-кофакторов ферментов является получение и реактивация их апоформ. Один из основных способов получения апоферментов заключается в связывании ионов металла-кофактора в устойчивый комплекс различными лигандами с последующим удалением их избытка и комплекса {металл-лиганд} диализом либо хроматографически. Известно, что для получения апоферментов различных алкогольдегидрогеназ в качестве лигандов часто используют азотсодержащие гетероциклические соединения.

Нами показано, что для получения апо-алкогольдегидрогеназы из печени лошади наиболее целесообразно использовать в качестве лиганда 1,10-фенантролин при его 500-кратном количестве по отношению к ферменту и

времени инкубирования с ним 30 мин. В присутствии 1,10-фенантролина в указанных условиях достигается наибольшая степень ингибирования фермента - 84%; кроме того, наибольший реактивирующий эффект цинка(II) на апо-АДГ из другого источника — пекарских дрожжей, достигался при ее получении с помощью именно этого лиганда.

Нами установлено, что ни 1,10-фенантролин, ни другие изученные лиганды не подавляют каталитическую активность фермента полностью (2,6-дипиколиновая кислота ингибирует АДГ на 72%, 1,2,3-бензотриазол — на 42%). Из этого следует, что ингибирующее действие всех этих лигандов (L) объясняется образованием тройного комплекса {апофермент—Zn(II)—L} при их взаимодействии с металлом-кофактором, в результате чего связь апофермент—Zn(II) не разрывается, а лишь частично ослабляется. Очевидно, в таком случае в реакционной смеси помимо указанного комплекса, называемого "псевдоапоферментом", присутствует также избыток свободного лиганда.

При введении в индикаторную реакцию 6 - 125 мкг/мл Zn(II) активность фермента, предварительно ингибированного 1,10-фенантролином, возрастает. В реакционной системе в указанных условиях присутствует тройной комплекс с ослабленной связью апофермент—Zn(II). Возрастание скорости индикаторной реакции при добавлении цинка(II) извне объясняется, по-видимому, связыванием свободными ионами Zn(II) в первую очередь лиганда, находящегося в избытке в растворе, а затем того, который входит в состав комплекса, т.е. имеет место конкурентное комплексообразование.

Для выяснения механизма реактивации псевдоапо-алкогольдегидрогеназы, полученной в присутствии 1,10-фенантролина, ионами Zn(II) изучили влияние на ее активность кобальта(II), меди(II) и никеля(II), образующих устойчивые комплексы с 1,10-фенантролином и имеющих при этом близкие ионные радиусы с ионами цинка (табл.7).

Из табл. 7 видно, что реактивирующее действие ионов металлов возрастает в ряду  $\text{Cu(II)}=\text{Ni(II)}<\text{Zn(II)}<\text{Co(II)}$ . Для объяснения полученных данных необходимо учитывать устойчивость комплексов этих металлов не

только с 1,10-фенантролином, но и с компонентом буферного раствора - трис(гидроксиметил)аминометаном. Это позволяет разделить ионы изученных металлов по характеру взаимодействия с псевдоапо-АДГ на две группы.

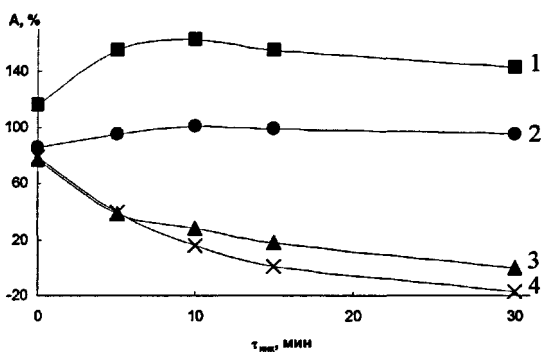
Ионы меди и никеля взаимодействуют как с лигандом, находящимся в тройном комплексе, так и с функциональными группами биокатализатора. Эти ионы отличаются от ионов металла-кофактора размерами и прочнее связываются с гистидином фермента, вызывая, таким образом, значительное перераспределение локального заряда. Поскольку восстановление активности псевдоапо-АДГ за счет удаления лиганда из комплекса {апофермент-Zn(II)-L} по скорости уступает вышеупомянутому процессу, в результате наблюдается ингибирование фермента, а не его реактивация.

**Таблица 7.** Степени реактивирующего действия (А, %) на псевдоапо-АДГ, полученную с помощью 1,10-фенантролина (L), ионов металлов; их радиусы; константы устойчивости их комплексов с 1,10-фенантролином и трис(гидроксиметил)аминометаном (ТРИС).

Me(II)	Ионный радиус, Å	$lg\beta_3$ {MeL <sub>3</sub> }	$lg\beta$ {Me-ТРИС}	А, %	
				$\tau_{инк}$ апофермента с ионом металла, мин	
				0	5
Zn	0.83	17.00	2.94	86	94
Co	0.82	19.90	1.73	117	155
Cu	0.73	21.35	3.95	78	39
Ni	0.78	17.57	2.63	77	38

Ионы цинка и кобальта реализуют свое действие по той же схеме, что и ионы меди и никеля, однако их связывание с псевдоапоферментом вызывает не падение, а возвращение активности АДГ, т.е. имеет место истинная реактивация. Это обусловлено, прежде всего, тем, что ионы цинка являются для АДГ кофактором, а ионы кобальта имеют предельно близкий к нему ионный радиус, т.е. служат "аналогом кофактора".

Изучены зависимости степеней реактивации псевдоапо-АДГ из печени лошади ионами Cu(II), Ni(II), Zn(II) и Co(II) от времени их совместного инкубирования с апоферментом. Из рисунка видно, что при 10-минутном выдерживании с псевдоапоферментом усиливается ингибирование АДГ ионами меди и никеля и возрастает реактивирующее действие ионов цинка и кобальта. Достижение существенно большей каталитической активности АДГ в присутствии кобальта (A=162%) связано, очевидно, с тем, что в отличие от металла-кофактора (A=102%) он не ингибирует нативный фермент.



**Рисунок.** Зависимость степени реактивации псевдоапо-алкогольдегидрогеназы, полученной в присутствии 1,10-фенантролина, от времени ее инкубирования с ионами кобальта(II) (1), цинка(II) (2), никеля(II) (3) и меди(II) (4) ( $C_{Me(II)} = 100$  мкг/мл).

Таким образом, селективно реактивировать ионами цинка псевдоапофермент, полученный добавлением 1,10-фенантролина в его 500-кратных количествах, невозможно из-за наличия в растворе слишком большого избытка лиганда. Следовательно, для разработки селективной и чувствительной методики определения металла-кофактора АДГ из печени лошади необходимо получить ее истинный апофермент.

Для получения истинного апофермента избыток комплексообразующего агента удаляли диализом. При варьировании различных параметров — времени диализа, концентрации лиганда и природы буферного раствора — установлено,

что в условиях эксперимента избыток 1,10-фенантролина полностью не удаляется. Вследствие этого реактивирующий эффект малых концентраций ионов металлов незаметен из-за связывания их с избытком лиганда. Проведение диализа в динамических условиях не позволило повысить эффективность ингибирования АДГ 1,10-фенантролином. Однако апофермент, полученный при постоянном перемешивании диализной системы при тех же соотношениях фермента и лиганда, что и в статических условиях, может быть частично (на 17%) реактивирован ионами цинка при их концентрации 0.1 мкг/мл. Незначительная степень реактивации апо-алкогольдегидрогеназы из печени лошади может быть следствием того, что 1,10-фенантролин в процессе длительного диализа извлекает не только "каталитический", но и "структурный" цинк, в результате чего происходит частичная необратимая денатурация фермента.

Использование другого эффективного комплексообразующего агента - 2,6-дипиколиновой кислоты (табл.8), показало, что вследствие меньших размеров ее молекулы при сопоставимой устойчивости комплекса с  $Zn(II)$ , она способна более свободно проникать в структурный карман, содержащий активный центр АДГ, и более эффективно связывать металл-кофактор. Следует отметить, что при малых временах диализа (6 и 12 ч) и соотношении концентраций фермента и лиганда 1:250, появляется крайне слабое, но четко фиксируемое реактивирующее действие ионов кобальта(II) ( $A=8\%$  при  $c_{Co} = 1$  нг/мл) при отсутствии такового для ионов металла-кофактора. По всей видимости, этот факт обусловлен тем, что при примерно равной устойчивости комплексов 2,6-дипиколиновой кислоты с цинком ( $lg\beta_2=12.43$ ) и кобальтом ( $lg\beta_2=12.70$ ), первый ингибирует фермент, а второй - нет.

В присутствии 500-кратного молярного избытка 2,6-дипиколиновой кислоты диализный раствор мутнел, что свидетельствует о денатурации белка. Следовательно, в условиях проведения эксперимента получение апофермента, полностью лишённого каталитической активности, не представляется возможным. Малая степень реактивации апо-АДГ, полученной в других

условиях, указывает, прежде всего, на необратимые изменения, происходящие при длительном выдерживании фермента в диализате, содержащем органический лиганд.

**Таблица 8.** Степени ингибирования алкогольдегидрогеназы из печени лошади 2,6-дипикколиновой кислотой при различном времени выдерживания в растворе диализата и "отмывной" жидкости (I — статические и II — динамические условия проведения диализа)

E: L	Время выдерживания, ч		Степень ингибирования фермента, % (P=0.95, n=3)	
	L+фосфатный буферный раствор (pH 7.6)	Фосфатный буферный раствор (pH 7.6)	I	II
1:750	24	24	—*	46±3
	12	12	—	35±2
	6	6	—	30±2
	3	3	96±3	20±2
1:500	24	24	—**	—
	12	12	—**	—
	3	3	91±3	—
1:333	3	3	83±2	—
	2	2	50±2	—
1:250	6	6	75±5	45±3
	3	3	65±4	38±3
1:125	3	3	40±1	14±1
	1	1	12±1	—

\*- эффект не изучен; \*\* - помутнение диализного раствора

Таким образом, проведенные исследования показали, что, очевидно, в силу большей доступности "структурного" и меньшей - "каталитического" ионов цинка алкогольдегидрогеназы из печени лошади по сравнению с ферментом, выделенным из пекарских дрожжей, из молекулы первого фермента неселективно удаляются оба иона, что вызывает его денатурацию. Вследствие этого невозможно получение истинной апо-алкогольдегидрогеназы и, соответственно, ее реактивация.



В целом, полученные нами данные свидетельствуют о наличии существенных различий в строении и свойствах алкогольдегидрогеназ, выделенных из печени лошади и пекарских дрожжей, наряду с общими чертами принципиального характера. Эти обстоятельства имеют не только теоретическую, но и практическую значимость, поскольку они позволят с высокой степенью надежности выбрать определенный препарат фермента для решения той или иной аналитической задачи.

### **Выводы**

1. В результате изучения влияния ионов тяжелых металлов на каталитическую активность АДГ из печени лошади показано, что наиболее эффективными ее ингибиторами являются Hg(II), Ag(I), Zn(II). Впервые выявлено ингибирующее действие на фермент олова(IV). Установлен смешанный тип ингибирования фермента ионами ртути(II).
2. Установлено ингибирование АДГ из печени лошади метилпроизводными ртути и олова и выяснено, что оно реализуется по одному и тому же (бесконкурентному) типу. Показано, что по аналогии с Hg(II) и Sn(IV), органические соединения ртути являются более эффективными ингибиторами АДГ, чем оловоорганические.
3. В результате изучения влияния жирных кислот на АДГ из печени лошади показано, что наиболее эффективными ее ингибиторами являются одно- и двухосновные неразветвленные насыщенные карбоновые кислоты, содержащие 7-8 метиленовых фрагментов. На примере масляной кислоты установлен полностью конкурентный тип ингибирования фермента низшими жирными кислотами. Установлено, что высшие жирные кислоты не влияют на АДГ из пекарских дрожжей. На примере валериановой кислоты показано, что низшие кислоты оказывают сопоставимое действие на алкогольдегидрогеназы из разных источников.
4. Обнаружено, что аминокислоты, содержащие гетероциклический атом

азота, проявляют сопоставимое по степени ингибирующее действие смешанного типа на алкогольдегидрогеназы, выделенные из различных источников.

5. В результате изучения влияния азотсодержащих гетероциклических соединений установлено, что наиболее эффективными ингибиторами обоих ферментов являются те из них (1,2,3-бензотриазол, 1,10-фенантролин, 2,2'-дипиридил), которые содержат конденсированную систему, из нескольких ароматических колец. При этом большей чувствительностью к действию 1,10-фенантролина и 2,2'-дипиридила обладает АДГ из пекарских дрожжей, а к действию 1,2,3-бензотриазола и 2,6-дипиколиновой кислоты — АДГ из печени лошади.
6. Установлена и объяснена невозможность получения истинного апофермента АДГ из печени лошади и его реактивации ионами цинка(II). Обоснована целесообразность определения иона металла-кофактора по реактивации только апо-алкогольдегидрогеназы из пекарских дрожжей.
7. Разработаны методики определения наиболее эффективных ингибиторов АДГ из печени лошади: ртути(II), серебра(I), цинка(II), олова(IV) ( $c_n = 0.05 - 1.0$  мкг/мл,  $s_r = 0.02 - 0.06$ ); метилртути ( $c_n = 1$  мкМ,  $s_r = 0.03$ ); пропионовой, масляной, валериановой, капроновой, пеларгоновой, каприновой, янтарной, глутаровой, себаценовой кислот ( $c_n = 1$  мкМ — 0.7 мМ,  $s_r = 0.01 - 0.03$ ); пролина, триптофана, гистидина ( $c_n = 0.01$  мМ,  $s_r = 0.05 - 0.06$ ); 1,2,3-бензотриазола и 2,6-дипиколиновой кислоты ( $c_n = 0.5$  и 1.0 мкМ,  $s_r = 0.03$  и 0.05 соответственно), чем обоснована целесообразность использования этого фермента в химическом анализе.
8. Предложены возможные объяснения причин различного или одинакового характера и степени ингибирования алкогольдегидрогеназ из печени лошади и пекарских дрожжей соединениями разных классов. Сопоставлены преимущества и недостатки использования обоих ферментов для определения их ингибиторов и кофактора.

## Публикации

1. Жмаева Е.В., Бычков П.В., Шеховцова Т.Н. Азотсодержащие органические реагенты как ингибиторы фермента алкогольдегидрогеназы. / Тез. докл. VII Всероссийской конференции "Органические реагенты в аналитической химии". Саратов. 1999. С. 72.
2. Zhmaeva E.V., Bychkov P. V., Shekhovtsova T. N. Enzymatic determination of inorganic and organic inhibitors of alcohol dehydrogenases. / Abstracts of Vth International Symposium "Kinetics in Analytical Chemistry". Romania. Bucharest. 2001. P. 145.
3. Bychkov P.V., Zhmaeva E.V., Shekhovtsova T.N. Application of alcohol dehydrogenases isolated from diverse sources for the determination of mercury(II) and methylmercury. / Proceedings of Biocatalysis-2002: Fundamentals and Applications. Moscow. 2002 . P.76 .
4. Bychkov P.V., Zhavoronkova A.M., Zhmaeva E. V., Muginova S.V., Shekhovtsova I.N. Determination of Zn(II) and Pb(II) using alkaline phosphatases and alcohol dehydrogenases from different origin and their apoenzymes. / Proceedings of Biocatalysis-2002: Fundamentals and Applications. Moscow. 2002 . P. 77.
5. Bychkov P., Shekhovtsova T.N. Enzymatic determination of fatty acids / Материалы международной конференции" студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Лочоносов-2002». Москва. 2002. С. 142.
6. Жмаева Е.В., Бычков П.В., Шеховцова Т.Н. Ферментативное определение ртути(II) и метилртути с использованием алкогольдегидрогеназ различного происхождения / Вестник МГУ. Серия Химия. 2002. Т.6. С.404-409.
7. Bychkov P., Shekhovtsova T. N. Enzymatic determination of fatty acids using alcohol dehydrogenase from horse liver. // Mend. Commun. 2003. N.2. P. 75-76.
8. Шеховцова Т.Н., Веселова И.А., Мугинова С.В., Жаворонкова А.М., Бычков П.В., Григорьева Д.Л. Ферментативные методы: пути расширения возможностей. Каталог рефератов и статей Международного Форума «Аналитика и аналитики», Воронеж. 2003. Т.1. С.77.
9. Shekhovtsova T.N., Muginova S.V., Bychkov P.V., Zhavoronkova A.M. Novel approach to improve possibilities of enzymatic methods of analysis. Book of abstracts. Euroanalysis XIII. European Conference on Analytical Chemistry. Spain. 2004. P. 52-69.

**№23 170**

**Подписано в печать 19 ноября 2004 г.**

**Заказ 453. Формат 60 х 90/16.**

**Тираж 100 экз.**

**Отпечатано в салоне оперативной печати «П.К.Ф.»  
Москва, Садовая-Черногрязская, 3Б. Тел. 778-97-47**