

С.А. Покрышкин¹, К.Г. Боголицын^{1,2}, А.С. Аксенов²

¹Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова

²Институт экологических проблем Севера УрО РАН

Покрышкин Сергей Александрович родился в 1987 г., окончил в 2009 г. Архангельский государственный технический университет, аспирант кафедры теоретической и прикладной химии Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова. Имеет 2 публикации в области ферментативной кинетики и катализа.

E-mail: serge.physchem@yandex.ru



Боголицын Константин Григорьевич родился в 1949 г., окончил в 1971 г. Архангельский лесотехнический институт, доктор химических наук, профессор, директор ИЭПС УрО РАН, проректор по научной работе и заведующий кафедрой теоретической и прикладной химии Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова, заслуженный деятель науки РФ. Имеет более 480 научных работ в области развития фундаментальных принципов «зеленой» химии и разработки физико-химических основ процесса переработки древесины.

E-mail: bogolitsyn@iepn.ru



Аксенов Андрей Сергеевич родился в 1982 г., окончил в 2004 г. Архангельский государственный технический университет, кандидат технических наук, зав. лабораторией химии растительных биополимеров ИЭПС УрО РАН. Имеет более 40 научных трудов в области химии биополимеров.

E-mail: biopolimer@iepn.ru



КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ ГВАЯКОЛА В ВОДНОЙ И ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКОЙ СРЕДАХ

Определены кинетические параметры реакции пероксидазного окисления гваякола пероксидом водорода в водной и водно-органической средах. Изучено влияние состава буферного раствора на активность фермента пероксидазы хрена в среде вода–диметилсульфоксид на примере реакции окисления гваякола. Показано стабилизирующее действие фталатного буферного раствора на активность пероксидазы в среде вода–ДМСО.

Ключевые слова: ферментативная кинетика, пероксидаза хрена, диметилсульфоксид, гваякол.

Окисление гваякола пероксидазами в присутствии пероксида водорода представляет собой основу для широко распространенного колориметрического метода анализа с использованием ферментов.

Однако природа образующихся в ходе реакции окрашенных в коричневый цвет продуктов не до конца изучена. Кроме того, актуально изучение кинетических закономерностей окисления гваякола не только в водной, но и в водно-органической среде, в которой способны растворяться высокомолекулярные фенольные соединения, например лигнины. Лучший бинарный растворитель для этих целей – смесь вода–диметилсульфоксид (ДМСО).

Пероксидаза из корней хрена (HRP), КФ 1.1.11.7 – гем-содержащий фермент, относящийся к классу пероксидаз растений, наиболее часто используется в биохимическом и медицинском анализе [2]. Гваякол является одним из природных субстратов для данного фермента, а также низкомолекулярным аналогом лигнина [4].

Цель данной работы – изучение влияния органического соразтворителя на кинетику процесса ферментативного окисления гваякола в водной среде.

В работе использовали изоферментные препараты С2 и С3 пероксидазы хрена «ВВИ Enzymes» со спектральным показателем чистоты $R_z = 2,30$. Активность фермента определяли по скорости реакции окисления субстрата – гваякола пероксидом водорода [7].

Концентрацию пероксида водорода контролировали спектрофотометрическим методом с использованием УФ спектрофотометра Spcord200 «Analytik Jena» по полосе поглощения 230 нм

(молярный коэффициент поглощения $72,7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). В качестве субстрата применяли гваякол производства «Sigma-Aldrich» Реактивы соответствовали квалификации «ос.ч.».

Реакцию пероксидазного окисления гваякола ($(0,05...1,70) \cdot 10^{-3} \text{ M}$) пероксидом водорода ($(10...170) \cdot 10^{-6} \text{ M}$) проводили при температуре $25 \text{ }^\circ\text{C}$ в среде фосфатного, фталатного или ацетатного буферного раствора при концентрации ДМСО от 0 до 10 % мольн. Процесс инициировали введением пероксидазы хрена ($0,05...1,00 \text{ ед./мл}$) при объеме реакционной смеси 3 мл. Спектры и кинетические кривые окисления гваякола записывали на двухлучевом спектрофотометре Spесord200. Ход реакции контролировали по поглощению в области характеристической полосы продукта ферментативного окисления гваякола. По результатам измерений рассчитывали начальную скорость реакции и кинетические параметры – константу Михаэлиса (K_m) и максимальную скорость (V_m), характеризующие скорость образования и распада фермент-субстратного комплекса. Кинетические параметры ферментативной реакции определяли из зависимостей начальных скоростей от концентрации субстрата в двойных обратных координатах и в координатах Лайнуивера–Берка [3]. Молекулярно-массовые распределения были получены методом ВЭЖХ с использованием жидкостного хроматографа Стайер со спектрофотометрическим детектором производства «Аквилон».

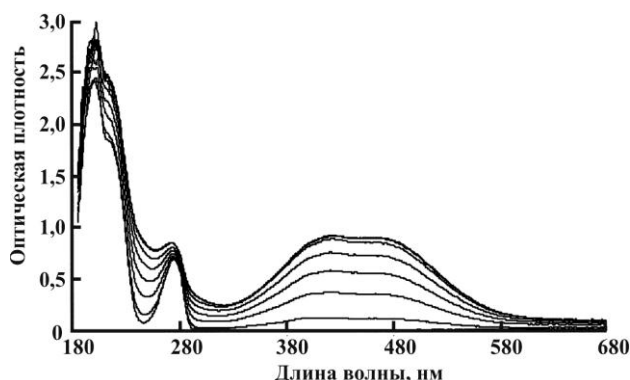


Рис. 1. Спектры поглощения продуктов пероксидазного окисления гваякола в водной среде (время реакции 4 мин с интервалом 40 с; pH 6,0; концентрация $C_{\text{гва}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$; $C_{\text{HRP}} = 1 \text{ ед./мл}$)

Гваякол (2-метоксифенол) был использован как модельное соединение лигнина и классический субстрат пероксидазы хрена, применяемый для измерения ее активности [7]. Раствор гваякола в присутствии пероксида водорода стабилен. При добавлении в реакционную смесь пероксидазы хрена наблюдается увеличение оптической плотности в области $400...500 \text{ nm}$ (рис. 1). В процессе ферментативного окисления в дифференциальных спектрах появляется максимум при 422 nm , отсутствующий в исходных. Он был использован в дальнейшем при кинетических исследованиях.

Продукт пероксидазного окисления гваякола, имеющий полосу поглощения 422 nm , может быть определен как 3,3'-диметокси-4,4'-бифенилхинон (рис. 2) [8]:

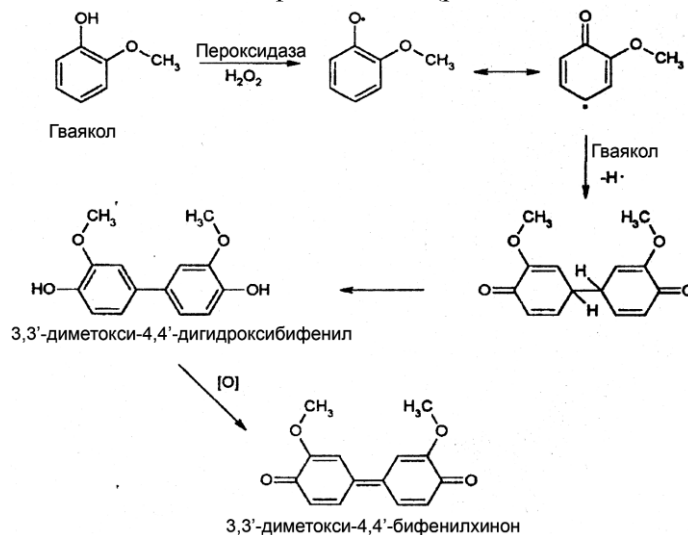


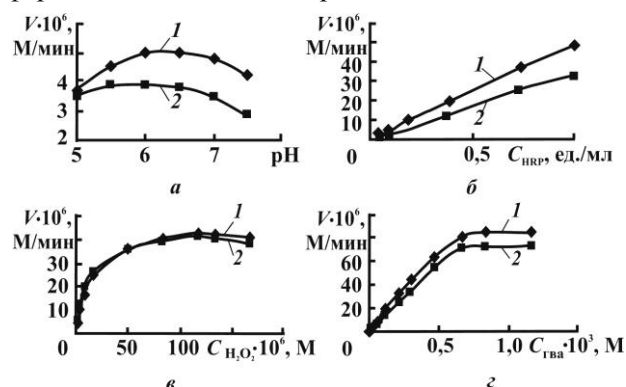
Рис. 2. Молекулярно-мас-совое распределение продуктов ферментативного окисления гваякола в водной среде (время реакции 30 с; рН 6,0; $C_{\text{гва}} = 1 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 100 \cdot 10^{-6}$ М; $C_{\text{HRP}} = 1$ ед./мл)



Поскольку ферментативное окисление гваякола – сложный процесс, идущий по смешанному ионно-радикальному механизму, в продуктах реакции присутствует не только данный димер, но и смесь олигомеров, что подтверждается полученным по методу ВЭЖХ молекулярно-массовым распределением образующихся в ходе реакции продуктов (рис. 2). Это объясняет отсутствие в ультрафиолетовых спектрах продуктов пероксидазного окисления гваякола изобестической точки и увеличение оптической плотности в широком диапазоне длин волн.

Как известно, пероксидаза хрена имеет ряд изоферментов, отличающихся между собой строением и каталитическими свойствами [9]. Поэтому было проведено сравнение ферментативной активности по отношению к гваяколу двух изоферментных препаратов (С2 и С3) пероксидазы хрена. Изучено влияние рН, концентраций субстратов и фермента на скорость реакции. рН, при котором достигалась наибольшая скорость реакции (рис. 3, а), определяли с использованием буферного раствора при концентрации фермента $C_{\text{HRP}} = 0,2$ ед./мл, гваякола $C_{\text{гва}} = 1 \cdot 10^{-3}$ М, пероксида водорода $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 100 \cdot 10^{-6}$ М. Полученные зависимости имеют колоколообразную форму с пологим максимумом в диапазонах 5,5...6,5 для изофермента С3 и 6,0...6,5 для изофермента С2. Исследование влияния концентрации фермента (рис. 3, б) осуществляли при концентрации пероксида водорода $100 \cdot 10^{-6}$ М и концентрации гваякола $1 \cdot 10^{-3}$ М в фосфатном буферном растворе (рН 6,0). Поскольку скорость реакции с ростом концентрации фермента линейно возрастала, в дальнейшем использовали

концентрацию, соответствующую линейному ходу реакции в течение 3...5 мин (0,2 ед./мл). Влияние концентрации пероксида водорода (рис. 3, в) изучали при концентрации гваякола $1 \cdot 10^{-3}$ М и концентрации фермента 0,2 ед./мл в фосфатном буферном растворе (рН 6,0). Зависимости начальной скорости реакции от концентрации пероксида водорода для двух изоферментов имеют вид прямой с выходом на плато при концентрации пероксида водорода $(120...130) \cdot 10^{-6}$ М. Использование пероксида водорода концентрацией более $150 \cdot 10^{-6}$ М приводит к снижению скорости реакции, что вызвано ингибированием фермента избытком субстрата-окислителя [3]. Влияние



концентрации гваякола (рис. 3, г) изучали при концентрации пероксида водорода $100 \cdot 10^{-6}$ М и концентрации фермента 0,2 ед./мл в среде фосфатного буферного раствора (рН 6,0). Для гваякола также отмечена линейная зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата, которая выходила на плато при концентрации гваякола $0,8 \cdot 10^{-3}$ М. Дальнейшего увеличения концентрации ингибирования избытком субстрата не наблюдалось.

Для исследования активности фермента в водно-органической среде был выбран изофермент С2, обладающий большей каталитической активностью. Для данного изофермента определены оптимальное значение рН, равное 6,0, и концентрации субстратов, соответствующие максимальной скорости реакции: $100 \cdot 10^{-6}$ М – для пероксида водорода, $1 \cdot 10^{-3}$ М – для гваякола (рис. 4).

Полученные данные свидетельствуют о высокой активности фермента по отношению к низкомолекулярным фенолам в водной среде. Для окисления высокомолекулярных фенольных соединений перспективно использовать водно-органическую среду, в которой они имеют большую растворимость. Для проведения реакции в среде смешанного водно-органического

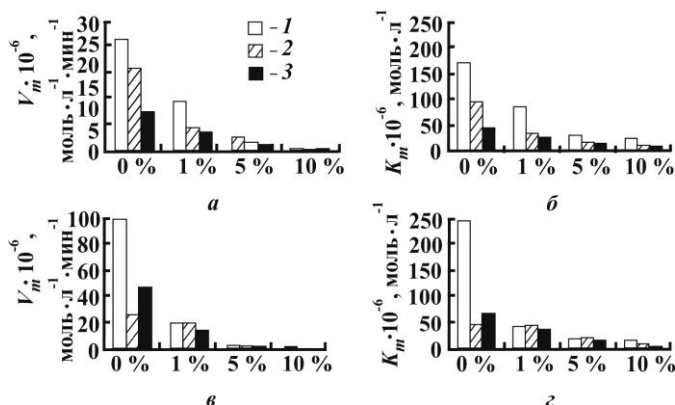
Рис. 3. Зависимость начальной скорости реакции от рН раствора (а); концентраций фермента (б), пероксида водорода (в) и гваякола (г): 1 – препарат С2,

растворителя, как показано в [1, 5, 6], одним из основных способов адаптации фермента и сохранения активности является иммобилизация или включение его в полиэлектролитный комплекс, в частности, с хитозаном. Поскольку на процесс образования полиэлектролитного комплекса с пероксидазой влияет состав буферного раствора [1], нами было исследовано его действие на реакционную способность нативной пероксидазы в водно-органической среде. В качестве буферных растворов использовали фосфатный, фталатный и ацетатный, имеющие следующие характеристики: рН 6,0, ионная сила 0,1 моль/л, концентрация ДМСО – от 0 до 10 % мольн., фермента – $C_{HRP} = 0,8$ ед./мл.

Как видно из полученных результатов (рис. 4), состав буферного раствора оказывает сильное влияние на кинетические параметры реакции. Так, при использовании фталатного

Рис. 4. Зависимость кинетических констант V_m (а, в) и K_m (б, г) ферментативной реакции от концентрации ДМСО и вида буферного раствора: а, б – гваякол, в, г – пероксид водорода; 1 – фталатный буферный раствор, 2 – фосфатный,

3 – ацетатный



буферного раствора в водной среде полученные кинетические константы (K_m и V_m) на 20...60 % больше, чем при использовании фосфатного или ацетатного. Введение 1 % ДМСО приводит к снижению констант реакции в среднем на 40...80 %, при этом уменьшается разница между константами, вызванная влиянием буферных растворов, что можно объяснить сильным воздействием органической фазы на фермент. В тоже время, добавка ДМСО оказывает сравнительно меньшее воздействие на активность пероксидазы во фталатном буферном растворе, что говорит о некотором стабилизирующем действии фталат-иона. При сравнении полученных кинетических параметров реакции установлено, что наиболее сильно в присутствии ДМСО фталат-ион стабилизирует взаимодействие фермента с гваяколом, но не оказывает заметного влияния на комплекс пероксидаза–пероксид водорода.

Таким образом, проведенные исследования кинетических свойств фермента в водно-органической среде показали снижение скорости реакции ферментативного окисления гваякола в присутствии нативной пероксидазы хрена при увеличении содержания ДМСО в растворе. Подтверждено предположение о влиянии состава буферного раствора на реакционную способность фермента и его стабильность в органической фазе. Установлено, что наибольшее стабилизирующее воздействие на фермент оказывает фталатный буферный раствор. Для дальнейшего увеличения стабильности биокатализатора необходимо переводить его в иммобилизованное состояние. Перспективным методом является включение пероксидазы в полиэлектролитный комплекс с хитозаном.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Веселова И.А., Кирейко А.В., Шеховцова Т.Н. Повышение каталитической активности и стабильности пероксидазы хрена за счет включения ее в полиэлектролитный комплекс с хитозаном // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т.45, № 2. С. 143–148.
2. Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биологической химии. 2006. Т. 46. С. 303–322.
3. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты / пер. с англ. В 3 т. Т. 1. М.: Мир, 1982. 389 с.
4. Физическая химия лигнина / К.Г. Боголицын [и др.]. М.: Академкнига, 2010. 492 с.
5. Яблоцкий К.В. Новые аспекты применения нативной и иммобилизованной пероксидазы хрена для определения ее ингибиторов и субстратов: автореф. дис. ... канд. хим. наук. М., 2010. 28 с.
6. Azevedo Anna M., Durate M.F. Stability of free and immobilized peroxidase in aqueous-organic solvent mixtures // J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2001. N 15. P. 147–153.
7. Bergmeyer H.U. Methods of enzymatic analysis 2nd Edition. New York: Academic Press, 1974. 495 p.

8. *Doerge D.R., Divi R.L., Churchwell M.I.* Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases // *Analytical biochemistry*. 1997. N 250. P. 10–17.

9. *Torres E., Ayala M.* Biocatalysis based on heme peroxidases. Berlin-Heidelberg: Springer, 2010. 358 p.

Поступила 20.10.11

S.A. Pokryshkin¹, K.G. Bogolytsyn^{1,2}, A.S. Axenov²

¹Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov

²Institute of Ecological Problems of the North, Ural Division of RAS

Kinetic Regularities Parameters of Guaiacol Enzymic Oxidation in the Aquatic and Water-Organic Mediums

Kinetic parameters of peroxidase oxidation reaction of guaiacol by the hydrogen peroxide in the aquatic and water-organic mediums have been characterized. Effect of buffer solution composition on the enzymatic activity of horseradish peroxidase in the water-dimethyl sulfoxide medium has been studied. Stabilizing effect of phthalate buffer solution on the peroxidase activity is shown.

Key words: fermentative kinetics, horseradish peroxidase, dimethyl sulfoxide, guaiacol.

