

УДК 577.152.193

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ РЕДЬКИ ЧЕРНОЙ ОТНОСИТЕЛЬНО НЕОРГАНИЧЕСКОГО СУБСТРАТА $S_2O_3^{2-}$

Вяткина О.В., Лаврентьева И.В., Ермакова М.О.

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

В статье изложены результаты исследований, подтверждающих каталитическое действие пероксидазы редьки черной в системе с пероксидом водорода и тиосульфатом натрия. Определены эффективные кинетические параметры изучаемого процесса и средняя молярная активность фермента относительно тиосульфат-иона. Установлены оптимумы концентраций субстратов окислителя и восстановителя и температурный интервал, позволяющие достичь максимальной эффективности окисления исследуемого субстрата.

Ключевые слова: пероксидаза, кинетические параметры, неорганический субстрат, пероксид водорода.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что субстратами пероксидазы являются соединения, резко различающиеся по структуре и химическим свойствам. Проблема субстратной специфичности классических пероксидаз растений до сих пор не решена [1]. Каждый фермент имеет свой собственный профиль субстратной специфичности, и в настоящее время, к сожалению, нельзя заранее предсказать, какова будет активность фермента по отношению к выбранному субстрату. При этом считается, что структура субстрата определяет характер его взаимодействия с ферментом и предполагает наличие дифференциации каталитических центров для субстратов различной природы [2]. Кроме того, необходимо учитывать, что активность растительных пероксидаз во многом зависит от климатических и экологических условий произрастания исходного сырья и от способа его выделения [1, 3].

Следует отметить, что группа органических субстратов пероксидазы весьма обширна и достаточно хорошо изучена в отличие от неорганических субстратов [2, 4–6]. Поэтому целью нашей работы было исследование каталитической активности фосфатно-буферного экстракта пероксидазы, выделенного из корнеплода редьки черной, произрастающей в Крыму, в системе $S_2O_3^{2-}$ – H_2O_2 – H_2O –фермент.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась пероксидаза корнеплодов редьки черной. Для получения экстракта растительное сырье подвергли очистке стандартным методом [7] и измельчили на пластмассовой терке. Экстракцию проводили фосфатным буфером с pH 7,0.

Определение средней пероксидазной активности ферментного препарата проводили в системе (I): $C(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,05$ моль/л, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,02$ моль/л ($V(\text{ферм. преп.}) = 5, 7, 10$ мл). Общий объем системы доводили дистиллированной водой до 23,1 мл.

Молярную активность фермента рассчитывали по формуле (1)

$$A = \frac{\Delta v}{\tau \cdot V} \quad (1)$$

Где: $\Delta v = v_{\text{нач}}(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) - v_{\text{кон}}(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})$ – количество вещества окисленного тиосульфата, мкмоль;

τ – время, с;

V – объем ферментного препарата в исследуемой системе

За единицу активности принимали количество окисленного субстрата (мкМ), катализированное 1 мл ферментного препарата в течение 1 с (2).

$$1 \text{ e. a.} = \frac{\text{МКМОЛЬ}}{\text{мл} \cdot \text{с}} \quad (2)$$

Изучение каталитической активности пероксидазы редьки черной относительно субстрата окислителя (H_2O_2) и субстрата восстановителя ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) проводили в системах (II) и (III) при $t=25$ °C, pH=5. Система (II): $C_{\text{начальная}}(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,08$ моль/л ($C(\text{H}_2\text{O}_2)$ варьировали от 0,01 до 0,11 моль). Система (III): $C_{\text{начальная}}(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,02$ моль/л ($C(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$ варьировали от 0,022 моль/л до 0,08 моль/л). Объемная концентрация ферментного препарата в системах составляла $C_{\text{об}} = 20\%$

Смесь оставляли на 10 минут, а реакцию окисления тиосульфата останавливали введением в систему 1 мл 0,2 н H_2SO_4 . Остаточные концентрации $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в исследуемых системах устанавливали методом йодиметрического титрования [8]. Экспериментальные данные использовали для расчета начальных скоростей реакции (w) (3) и степени конверсии тиосульфата в исследуемых системах ($\alpha, \%$) (4).

$$W = - \frac{\Delta C}{\Delta \tau}; \quad (3)$$

Где $\Delta C = C_{\text{кон}}(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) - C_{\text{нач}}(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})$ – разница конечной и начальной концентраций тиосульфата, моль/л;

$\Delta \tau = \tau_{\text{кон}} - \tau_{\text{нач}}$ – временной интервал, с;

$$\alpha = \frac{C_{\text{нач}} - C_{\text{кон}}}{C_{\text{нач}}} \cdot 100\% \quad (4)$$

Где: $C_{\text{нач}}$ – начальная концентрация ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$)- в системе;

$C_{\text{кон}}$ – конечная концентрация ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) в системе.

Эффективные кинетические параметры: порядок ($n_{\text{эф}}$) и константу скорости реакции ($k_{\text{эф}}$) определяли графическим методом в координатах Вант-Гоффа [9]. Для расчета максимальной скорости ферментативной реакции (w_{max}) и константы Михаэлиса (K_m) использовали координаты Лайнуивера–Берка [9].

Для подтверждения каталитического действия пероксидазы редьки черной в реакции окисления тиосульфата исследовали кинетику его окисления в пероксидом водорода в системе (IV), не содержащей фермент. Система (IV): $C(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,042$ моль/л, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,02$ моль/л, $V(\text{H}_2\text{O}) = 1,75$ мл.

Для изучения влияния температуры на окислительную активность фермента относительно $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ использовали систему (V): $C(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,042$ моль/л, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,02$ моль/л, $C_{\text{об}}(\text{фермента}) = 20\%$. Активность исследовали в диапазоне температур от 0 °С до 85 °С. Растворы титровали охлажденными, чтобы избежать понижения чувствительности крахмала.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе изучения пероксидазной активности в системе (I) определили, что средняя пероксидазная молярная активность фосфатно-буферного экстракта фермента относительно неорганического электронодонорного субстрата $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ составляет 2,5 е.а.

Результаты кинетических исследований в системах (II), (III), (IV) приведены в Таблице 1.

Таблица 1
Сравнительная характеристика кинетических параметров исследуемых систем

Параметр	Система		
	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}-\text{H}_2\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}$	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}-\text{H}_2\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}-\text{пероксидаза}$	
		по восстановителю ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$)	по окислителю (H_2O_2)
$k_{\text{эф}}$	$2,2 \cdot 10^{-5}$	$6,3 \cdot 10^{-4}$	$8,7 \cdot 10^{-5}$
$n_{\text{эф}}$	0,4	≈ 1	0,1
w_{max} , моль/л·с	—	$2,4 \cdot 10^{-5}$	$6,2 \cdot 10^{-5}$
K_m , моль/л	—	$27 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$
\bar{A} , е.а.	—	2,5±0,2	

Эксперимент показал, что введение ферментного препарата в концентрации $C_{\text{об}}=20\%$ в систему $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}-\text{H}_2\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}$ на порядок увеличивает $k_{\text{эф}}$ окисления тиосульфата, порядок реакции при этом изменяется с 0,4 до 1, что подтверждает каталитическое действие фермента в данной системе.

Также было установлено, что при концентрациях тиосульфат-иона, превышающих 0,03 моль/л, скорость его окисления в присутствии фермента падает (рис. 1), что может быть связано либо со сменой механизма исследуемой реакции (5), либо с ингибированием фермента одним из продуктов, присутствующих в реакционной смеси.



Известно, что ингибиторами пероксидазы являются ионы, образующие прочные комплексы с ионом Fe^{3+} . Так, в избытке тиосульфат-ионов, обладающих высокой способностью к комплексообразованию с ионами железа, образуются растворимые комплексы $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)_4]^{6-}$ ($\beta_6=79,4$) и $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)]^+$ ($\beta_1=125,8$) [10]. Одновременно с образованием тиосульфатных комплексов железа возможно образование сульфитных $[\text{Fe}(\text{SO}_3)_3]^{3-}$, $[\text{Fe}(\text{SO}_3)_2]^{2-}$ комплексов железа [11]. Отметим, что с металлами ион $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ координирует через атом серы, поэтому тиосульфатные комплексы легко превращаются в соответствующие сульфиды, также являющиеся ингибиторами фермента [5].

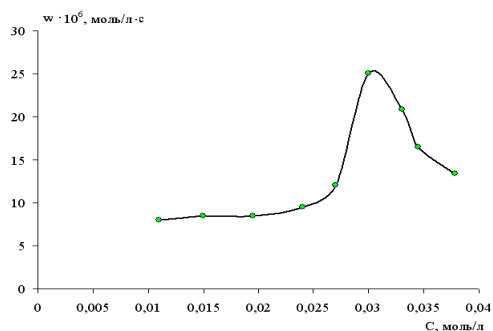


Рис. 1. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата восстановителя ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) в системе (III).

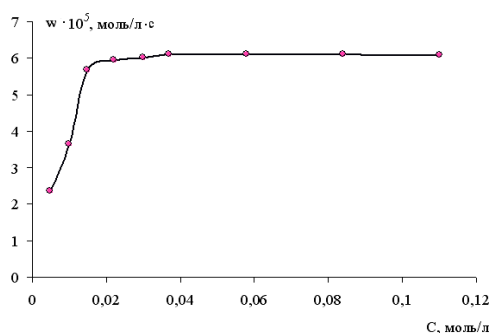


Рис. 2. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата окислителя (H_2O_2) в системе (II).

Полученные графическим методом в координатах Лайнуивера–Берка эффективные константа Михаэлиса и максимальная скорость реакции по субстрату восстановителю равные соответственно $27 \cdot 10^{-3}$ моль/л и $2,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л·с (табл. 1) находятся в полном соответствии с данными представленными на Рисунке 1. Зависимости начальной скорости реакций пероксидазного окисления тиосульфата от концентрации пероксида водорода представлена на Рисунке 2. При малых концентрациях субстрата-окислителя эта зависимость носит линейный характер, что соответствует первому порядку реакции по основному субстрату. При концентрациях пероксида водорода больше 0,015 моль/л, кривая зависимости скорости реакции от его концентрации выходит на плато, т.е. порядок реакции по пероксиду водорода становится близким к нулю (табл. 1), что полностью соответствует схеме Михаэлиса-Ментен [12].

Установили, что максимальная скорость исследуемой реакции $6,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л·с наблюдается при концентрации H_2O_2 равной 0,03 моль/л, а константа Михаэлиса по субстрату окислителю составляет $1,3 \cdot 10^{-3}$ моль/л (табл. 1), что говорит о значительно большей избирательности исследуемого фермента по отношению к субстрату-окислителю по сравнению с субстратом-восстановителем.

Результаты исследования зависимости активности исследуемого ферментного препарата, представленные на рисунках 3 и 4 показали, что максимальные скорость

реакции окисления тиосульфата ($w=3,6 \cdot 10^{-5}$ моль/л·с) и степень его конверсии ($\alpha=54\%$) достигаются в системе (V) в интервале температур $\Delta t_{\text{опт}}=16-40$ °С. Однако правило Вант-Гоффа в данных условиях не выполняется ($\gamma=1,4$).

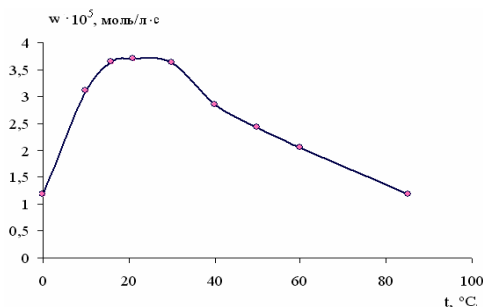


Рис.3. Зависимость начальных скоростей реакции ферментативного окисления тиосульфат-иона от температуры °С, (Система V).

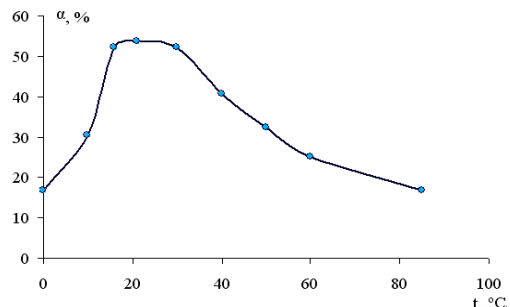


Рис.4. Зависимость степени конверсии тиосульфат-иона от температуры °С, (Система V).

ВЫВОДЫ

1. Определено, что средняя пероксидазная молярная активность фосфатно-буферного экстракта фермента относительно неорганического электронодонорного субстрата $S_2O_3^{2-}$ составляет 2,5 е.а.
2. Выявлено, что введение ферментного препарата в концентрации $C_{00}=20\%$ в систему $S_2O_3^{2-}-H_2O_2-H_2O$ на порядок увеличивает $k_{\text{эф}}$ окисления $S_2O_3^{2-}$, порядок реакции по тиосульфату при этом изменяется с 0,4 до 1, что подтверждает каталитическое действие фермента в данной системе.
3. Установлено, что эффективные значения константы Михаэлиса (K_m) и максимальная скорость (w_{max}) по субстрату-окислителю соответственно равны $1,3 \cdot 10^{-3}$ моль/л и $6,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л·с, по субстрату-восстановителю – $27 \cdot 10^{-3}$ моль/л и $2,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л·с.
4. Определены оптимумы концентраций субстратов окислителя и восстановителя и температурный интервал, позволяющие достичь максимальной эффективности окисления тиосульфат-иона в системе $S_2O_3^{2-}-H_2O_2-H_2O$ –пероксидаза; они равны $C_{\text{опт}}(S_2O_3^{2-})=0,03$ моль/л, $C_{\text{опт}}(H_2O_2)=0,03$ моль/л, $\Delta t_{\text{опт}}=16-40$ °С.

Список литературы

1. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов / Рогожин В.В. – М. : ГИАРД, 2004. – 240 с.
2. Андреева В.А. Фермент пероксидаза / В.А. Андреева– М. : Наука, 1988. – С.54–55.
3. Александрова Е.Ю. Изучение пероксидазной активности в экстрактах из корневища и корней хрена и ее стабильности к различным воздействиям / Е.Ю. Александрова, М.А. Орлова, П.Л. Нейман // Вестник Московского университета. Сер. Химия. – 2006. – Т. 47, – № 5. – С. 350–352.

4. Рогожин В.В. Аскорбиновая кислота – медленно окисляемый субстрат пероксидазы хрена. Биохимия / В.В. Рогожин, В.В. Верхотуров. – М.: МГУ, 1997. – 788 с.
5. Рогожин В.В. Роль индолил-3-уксусной кислоты в реакциях окисления быстро и медленно окисляемых субстратов пероксидазы / В.В. Рогожин, Т.В. Рогожина // Вестник Московского университета, Сер. 2. Химия. – 2004. – Т. 45, – № 6. – С. 423–428.
6. Айзенштадт М.А. Peroксидазное окисление лигнина и его модельных соединений / М.А. Айзенштадт, К.Г. Боголицын // Химия растительного сырья. – 2009. – № 2. – С. 5–18.
7. Селибер Г.Л. Большой практикум по микробиологии / Селибер Г.Л. – М.: Мир, 1962. – 492 с.
8. Основы аналитической химии. Практическое руководство / [В.И. Фадеева, Т.Н. Шеховцова, В.М. Иванов и др.]; под ред. Ю.А. Золотова. – [2 изд., испр.] – М.: Высшая школа, 2003. – С. 294–297.
9. Стромберг А.Г. Физическая химия / А.Г. Стромберг, Д.П. Семченко – М.: Высш. шк., 2001. – 526 с.
10. Хан Г.А. Флотационные реагенты и их применение / Хан Г.А., Габриелова Л.И., Власова Н.С. – М.: Недра, 1986. – 146 с.
11. Васёха М.В. Окислительно-восстановительные процессы в системе $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{SO}_4)\text{-Na}_2\text{SO}_3\text{-H}_2\text{O}$ с осаждением сульфита железа(II) – прекурсора для выделения Fe_2O_3 / М.В. Васёха, Д.Л. Мотов // Журн. прикладн. химии. – 2005. – Т. 78. – Вып. 1. – С. 41–44.
12. Багирова Н.А. Кинетика и катализ / Н.А. Багирова, Т.Н. Шеховцова. – М.: Наука, 1999. – С. 625.

Вяткіна О.В. Каталітична активність пероксидази редьки чорної відносно неорганічного субстрату $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ / **О.В. Вяткіна, І.В. Лаврентьєва, М.О. Єрмакова** // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2011. – Т. 24 (63), № 1. – С. 190-195.

У статті викладені результати досліджень, що підтверджують каталітичну дію пероксидази редьки чорної у системі з перекисом водню та тиосульфатом натрію. Визначені ефективні каталітичні параметри процесу що вивчався та середня молярна активність ферменту відносно тиосульфат-іону. Встановлено оптимуми концентрацій субстратів окиснювача та відновника, та температурний інтервал, що дозволяє досягти максимальної ефективності окиснення досліджуваного субстрату.

Ключові слова: пероксидаза, кінетичні параметри, неорганічний субстрат, перекис водню.

Vyatkina O.V. Catalytic activity of peroxidase of a black radish with inorganic substrate $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ / **O.V. Vyatkina, I.V. Lavrentieva, M.O. Ermakova** // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2011. – Vol. 24 (63), No. 1. – P. 190-195.

The article presents the results of studies confirming the catalytic effect of black radish peroxidase in the system with hydrogen peroxide and sodium thiosulphate. The effective kinetic parameters of the process being studied and the medium molar activity of the enzyme with thiosulphate ion were determined. Optimum concentration of substrate-oxidant and substrate-reductant and the temperature interval were established, allowing to reach maximum oxidation efficiency of the studied substrate.

Keywords: peroxidase, kinetic parameters, inorganic substrate, hydrogen peroxide.

Поступила в редакцію 24.03.2011 г.