

КИНЕТИКА ОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА В ПРИСУТСТВИИ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

В.В. Рогожин, Д.В. Перетолчин

Реакцией Клайзена метилкетонов с диэтилоксалатом в присутствии натрия или гидрида натрия получены динарий-1,6-диоксо-2,4-алкадиен-3,4-диолы, при подкислении которых выделены 3,4-дигидрокси-2,4-алкадиен-1,6-дионы (1,3,4,6-тетракарбонильные соединения (ТКС)). Изучены цепные и кольчато-цепные таутомерные равновесия в растворах ТКС. Исследованы особенности строения синтезированных соединений методами ИК и ЯМР ^1H спектроскопии.

Ключевые слова: реакция Клайзена, 1,3,4,6-тетракарбонильные соединения, цепная таутомерия, кольчато-цепные интерконверсии.

Введение

Аскорбиновая кислота является одним из низкомолекулярных антиоксидантов живых организмов. Специфическим ферментом, окисляющим аскорбиновую кислоту служит аскорбатоксидаза (КФ 1.10.3.3). Кроме того, аскорбиновая кислота может окисляться в реакциях пероксидазного окисления, катализируемых пероксидазой (КФ 1.11.1.7) [1, 2]. Однако участие аскорбиновой кислоты в оксидазных реакциях, протекающих в присутствии пероксидазы, практически не изучено. Хотя известно, что пероксидаза способна катализировать реакции оксидазного и пероксидазного окисления субстратов неорганической и органической природы. Наличие у фермента двух различных функций (оксидазной и пероксидазной) позволяет предположить, что в каталитическом действии фермента могут принимать участие два независимых активных центра, пространственно разделенных, хотя и близко расположенных друг от друга на поверхности белковой глобулы [3]. Такая полифункциональность пероксидазы модулируется ионами металлов и состоянием микросреды вблизи молекулы фермента [4, 5]. При этом идентификация пероксидазного и оксидазного участков фермента затруднена из-за недостаточности количественных данных о деталях структуры пероксидазы и ее молекулярной неоднородности [6].

Приоритет в открытии оксидазной функции пероксидазы принадлежит Теореллю [7], который обнаружил в растениях фермент, окисляющий дигидроксифумаровую кислоту с поглощением кислорода, и доказал, что этот фермент - пероксидаза. Оксидазными субстратами пероксидазы могут быть гидро-, нафтохиноны, индолилуксусная кислота, НАДН₂, НАДФН₂, флороглюцин, диоксифумаровая кислота, глутатион и др. [8-11].

Особенностью механизма действия пероксидазы в оксидазных реакциях является способность фермента в процессе каталитической реакции генерировать свободные радикалы: $\text{O}_2^{\cdot-}$, HO_2^{\cdot} и радикал органического субстрата. Типичным субстратом в оксидазных реакциях пероксидазы является диоксифумаровая кислота [12]. Оксидазное окисление ДФК исследовал Чане, используя метод остановленной струи при pH 4 [13]. Было показано, что для проведения реакции при 4 °C требовалось присутствие ионов марганца, однако повышение температуры способствовало протеканию реакции и в отсутствие ионов марганца. Для пероксидазы, активированной ионами марганца, Чане определил константу взаимодействия фермента с кислородом ($10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) и показал, что образующийся комплекс PO-O_2 реагирует с ДФК, с константой равной $4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

Широкое распространение пероксидазы в растительных и животных тканях позволяет говорить, что этот фермент выполняет многогранную работу в биогенных системах. Поэтому исследование структуры и механизма действия пероксидазы представляет не только теоретический интерес для понимания физиологической роли и принципов функционирования фермента, но и имеет важное практическое значение, поскольку пероксидаза широко используется в аналитических исследованиях [5]. Таким образом, в настоящей работе нами была изучена кинетика реак-

ций оксидазного окисления аскорбиновой кислоты в широком интервале рН и предложен возможный механизм действия фермента в этой реакции.

Методики исследования

Реактивы. В работе использовали пероксидазу хрена производства «Reanal» (Венгрия) со спектральным показателем чистоты $RZ=1,0$. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически при 403 нм ($\epsilon_{403}=100 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [14] и пиридингеохромогену [15]. В качестве субстрата применяли аскорбиновую кислоту от фирмы «Serva» (Германия), концентрацию которой определяли при 265 нм, пользуясь молярным коэффициентом поглощения, равным $7000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [16]. Концентрацию растворенного кислорода определяли полярографическим методом [17].

Методы. Реакцию оксидазного окисления АК (9,0–240,0 мкМ) кислородом ($2,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) проводили при 25°C в среде 0,1 М Na-ацетатного (рН 3,5–6,0) или Na-фосфатного (рН 6,0–8,0) буфера, объемом 2,5 мл с участием пероксидазы хрена в концентрации 8,0–24,0 нМ. Кинетические кривые окисления АК регистрировали на двухлучевом спектрофотометре DMS 100 S фирмы Varian (США) по уменьшению поглощения на 265 нм. За единицу активности фермента принимали количество мкмоль аскорбиновой кислоты, окисленной за 1 мин. При всех рН регистрировали реакции неферментативного окисления аскорбиновой кислоты, значения которых учитывались при анализе ферментативных реакций. Кажущиеся константы скорости окисления аскорбиновой кислоты определяли из данных по стационарной кинетике. Кинетические параметры ферментативной реакции определяли из зависимостей начальных скоростей от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка [18].

Результаты и их обсуждение

Показано, что в стационарных условиях начальная скорость оксидазного окисления аскорбиновой кислоты подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. На рис. 1 показана зависимость начальной скорости оксидазного окисления АК от ее концентрации в двойных обратных координатах при рН 3,5, 6,0 и 7,0. Аналогичные зависимости были получены и для других значений рН. При этом на зависимости начальной скорости от концентрации АК наблюдается излом, который сохраняется и при варьировании концентрации фермента (рис. 2).

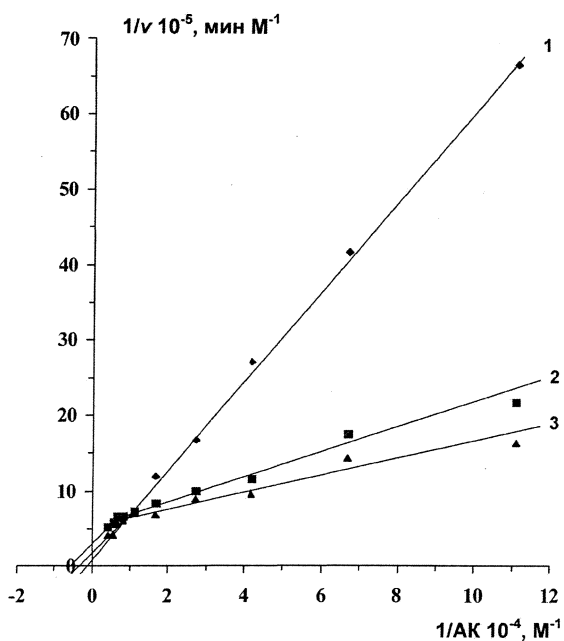


Рис. 1. Зависимости начальных скоростей оксидазного окисления аскорбиновой кислоты в координатах Лайнуивера-Берка при рН 3,5 (1), 6,0 (2), 7,0 (3) в присутствии пероксидазы. Концентрации: пероксидаза – 16 нМ; аскорбиновой кислоты – 9–240 мкМ; 0,1 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,0, 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 3,5 и 6,0

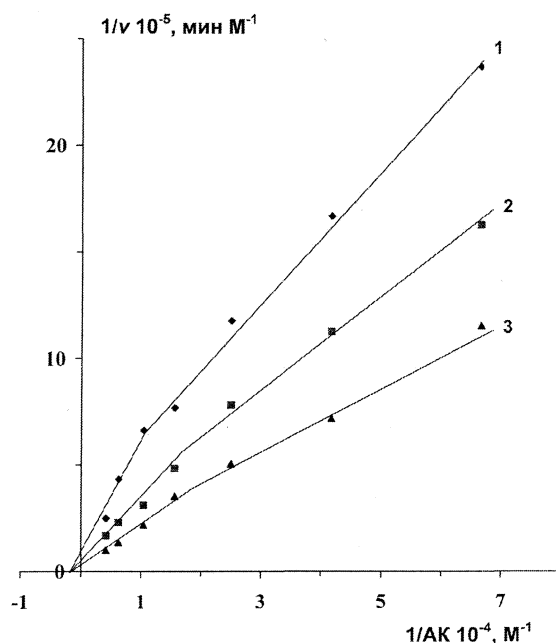


Рис. 2. Зависимости начальных скоростей оксидазного окисления аскорбиновой кислоты в координатах Лайнуивера-Берка при различных концентрациях пероксидазы, нМ: 8,0 (1), 16,0 (2), 24,0 (3). Концентрации: аскорбиновой кислоты – 15–240 мкМ; 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 4,5

Наличие таких зависимостей начальной скорости может свидетельствовать о том, что в активном центре фермента могут связываться несколько молекул АК. При этом каталитический процесс инициируется при связывании в активном центре фермента одной молекулы АК при рН 3,5-8,0 с K_{m1} равной 24-333 мкМ. При связывании двух молекул АК в активном центре наблюдается активирование фермента. Схожие зависимости были выявлены при исследовании реакций пероксидазного окисления АК [1], что позволяет предположить возможность существования единого механизма в реакциях пероксидазного и оксидазного окисления аскорбиновой кислоты. При этом в обоих случаях, по-видимому, местом связывания субстрата является одна и та же область активного центра фермента и в реакции участвует железо гема.

Из графиков рН-зависимости $\lg k_{кат}$ (рис. 3) видно, что на реакции оксидазного окисления АК оказывают влияние две ионогенные группы, расположенные в области активного центра фермента с $pK \sim 5,7$ и $6,5$. При этом ионизация одной группы уменьшает, а другой - увеличивает $\lg k_{кат}$. Возможно, аналогичные две функциональные группы активного центра фермента, участвующие в связывании одной и двух молекул АК, проявляются на рН-зависимостях величин $\lg K_m$ реакций окисления АК (рис. 4).

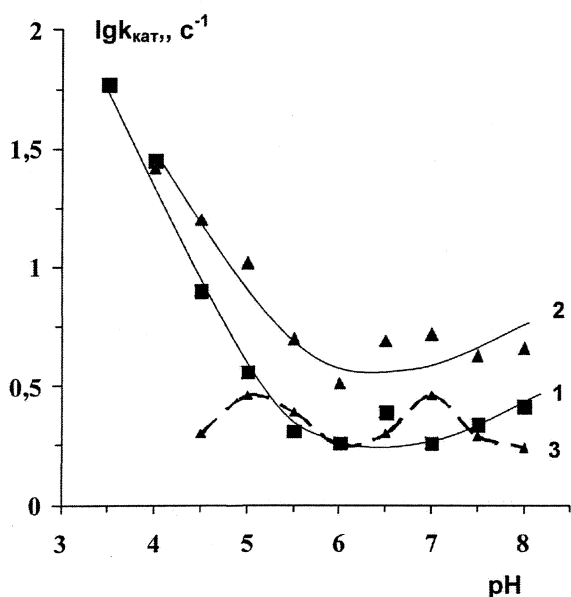


Рис. 3. рН-зависимости величин $\lg k_{кат}$ (1 и 2) и β (3) для реакций индивидуального оксидазного окисления аскорбиновой кислоты в присутствии пероксидазы, при связывании в активном центре фермента одной (1) и двух (2) молекул субстрата

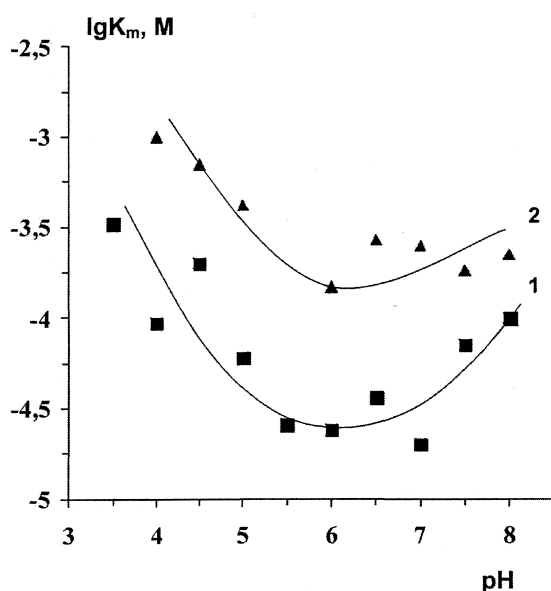


Рис. 4. рН-зависимости величин $\lg K_m$ для реакций индивидуального оксидазного окисления аскорбиновой кислоты в присутствии пероксидазы, при связывании в активном центре фермента одной (1) и двух (2) молекул субстрата

Кривые рН-зависимости на рис. 3 имеют разный наклон левой и правой частей, который не равен единице, а составляет 0,7-0,8. Такая особенность рН-зависимости обусловлена тем, что на депротонирование активной формы фермента оказывает влияние еще одна ионизирующая группа активного центра фермента с $pK \sim 8,0-9,0$, влияющая на каталитический процесс пероксидазы. Аналогичная зависимость наблюдалась в реакции окисления о-дианизидина [19].

В работе [10], при изучении реакций оксидазного окисления диоксифумаровой кислоты выявлено, что в катализе пероксидазы участвуют две ионогенные группы, протонизация которых влияет на активность фермента в области кислых значений рН (2,5-6,0). Причем при рН $\sim 3,0$ в структуре активного центра фермента создавалась конформация, обеспечивающая максимальные условия для окисления как диоксифумаровой кислоты, так и индолилуксусной кислоты [20].

Наличие активации в реакциях оксидазного окисления АК можно объяснить за счет связывания двух и более молекул АК в активном центре фермента. Однако при этом K_{m2} возрастает в 3,6-15,6 раз, что указывает на их меньшее сродство к участку связывания. При этом дополнительное связывание молекул АК ускоряет протекание каталитических реакций в 1,8-2,9 раз.

Для объяснения активации оксидазного окисления АК мы предложили следующую схему ферментативной реакции:

12. Saunders, B. Peroxidase: The properties and uses of a versatile enzyme and some related catalysts / B. Saunders, A. Holmes-Siedle, B. Stark. - London: Butterworths, 1964. - 271 p.
13. Chance, B. The kinetics and stoichiometry of the transition from the primary to the secondary peroxidase peroxide complexes / B. Chance // Arch. Biochem. Biophys. - 1952. - V. 41, № 2. - P. 416—424.
14. Ogawa, S. Calcium binding by horseradish peroxidase C and the heme environmental structure / S. Ogawa, Y. Shira, I. Morishima // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1979. - V. 90, № 2. - P. 674-678.
15. Falk, J.E. Porphyrins and metalloporphyrins / J.E. Falk. - Amsterdam: Elsevier, 1964. - 236 p.
16. Досон, Р. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс; пер. с англ. Ф. Друцы, О. Королевой. - М.: Мир, 1991 - С. 99-100.
17. Ляликов, Ю.С. Физико-химические методы анализа / Ю.С. Ляликов. - М.: Химия, 1974. - С. 410-456.
18. Березин, И.В. Практический курс химической и ферментативной кинетики / И.В. Березин, А.А. Клесов. - М.: Из-во МГУ, 1976. - 320 с.
19. Лебедева, О.В. Кинетическое изучение реакции окисления о-дианизидина перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена / О.В. Лебедева, Н.Н. Угарова, И.В. Березин // Биохимия. - 1977. - Т. 42, № 8. - С. 1372-1379.
20. Aerobic oxidation of indol-3-acetic acid catalysed by anionic and cationic peanut peroxidase / I.G. Gazarian, T.A. Chubar, E.A. Mareeva et al. // Phytochemistry. - 1999. - V. 51. - P. 175-186.
21. Рогожин, В.В. Влияние экзогенных этанола и ацетальдегида на жизнеспособность семян / В.В. Рогожин, П.С. Егорова // Этанол и его метаболизм в высших организмах: сб. науч. тр. - Якутск: Из-во ЯНЦ СО РАН, 1991. - С. 90-99.

Поступила в редакцию 16 июня 2009 г.

KINETICS OF OXIDASE OXIDATION OF ASCORBIC ACID BY HORSERADISH PEROXIDASE

It is studied stationary kinetics reactions oxidations of an ascorbic acid, catalyzed by horseradish peroxidase. It is shown, that the ascorbic acid is slowly oxidized substratum peroxidase, with low constants of linkage of substrata of initiating concentration. In an interval pH 3,5-8,0 sizes k_{cat} and K_m are certain. In high concentration (80-240 μ M) the ascorbic acid activates enzyme at all studied pH. The mechanism of action peroxidase in reactions oxidations of an ascorbic acid is offered.

Keywords: horseradish peroxidase, ascorbic acid, antioxidant, enzyme.

Rogozhin Vasilij Vasilievich - Dr. Sc. (Biology), Professor, Yakutsk State Agricultural Academy, Yakutsk.

Рогожин Василий Васильевич - доктор биологических наук, профессор, Якутская государственная сельскохозяйственная академия, г. Якутск.

Peretolchin Denis Valerievich - Postgraduate Student, Yakutsk State Agricultural Academy, Yakutsk.

Перетолчин Денис Валерьевич - аспирант, Якутская государственная сельскохозяйственная академия, г. Якутск.

E-mail: vrogozhin@mail.ru