

УДК 577.152.18

Е. А. Флюрик, ассистент (БГТУ); В. Н. Леонтьев, доцент (БГТУ);
О. Г. Буткевич, студентка (БГТУ); М. В. Чеушева, студентка (БГТУ)

ВЛИЯНИЕ ТИОЛОВ НА ПЕРОКСИДАЗНУЮ РЕАКЦИЮ ОКИСЛЕНИЯ *o*-ДИАНИЗИДИНА

Статья посвящена изучению кинетики реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина перекисью водорода в присутствии тиолов (β -меркаптоэтанола и дитиоэритритола). Приведены результаты кинетических исследований. Установлено, что реакция пероксидазного окисления *o*-дианизидина ингибируется на 50% при концентрациях ингибиторов 250,0 мкМ (β -меркаптоэтанол) и 7,0 мкМ (дитиоэритритол). Установлен сложный характер ингибирования реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина тиолами разного строения.

The article covers the studying of the kinetic of the reaction of peroxidase oxidation of *o*-dianisidine by hydrogen peroxide in the presence of thiols (β -mercaptoethanol and dithioeritritola). The results of the kinetic studies is shown. It was found that the rate of the reaction of peroxidase oxidation of *o*-dianisidine was inhibited by 50% at the concentration of inhibitor (β -mercaptoethanol) equal to 250,0 мкМ, and at the concentration of inhibitor (dithioeritritola) equal to 7,0 мкМ. In addition, the studies enabled to confirm the assumption about the complex nature of the inhibition by thiols of the different structure of the reaction of peroxidase oxidation of *o*-dianisidine.

Введение. Пероксидаза – один из весьма распространенных ферментов, интерес к изучению которого с годами не ослабевает. Повсеместное присутствие этого фермента в растительных и животных тканях, а также в составе первичных метаболитов грибов и бактерий дает основание считать его жизненно важным белком высших и низших организмов. Он является индуцибельным, реагирует на самые разнообразные воздействия, изменяя при этом набор своих изоэнзимов либо повышая активность уже присутствующих молекулярных форм.

Корневище хрена издавна используется в народной медицине как противовоспалительное, мочегонное, раздражающее, витаминное, отхаркивающее, фитонцидное, противцинготное, противомикробное и противогрибковое средство.

Пероксидаза хрена (КФ 1.11.1.7) (рис. 1) является одним из наиболее изученных ферментов своего класса [1].

Пероксидаза хрена – самый популярный биоаналитический фермент, который позволяет детектировать перекись водорода и ферменты, ее производящие [3], кроме того, широко применяется в аналитической биохимии и биотехнологии в качестве маркера антител и различных антигенов [4, 5].

Хотя пероксидазы обнаруживаются в тканях практически всех растений, в настоящее время основным источником коммерчески доступной пероксидазы являются корни хрена (*Armoracia rusticana*) [6].

В свойствах и действии различных пероксидаз много общего, хотя и имеются некоторые специфические особенности в отдельных стадиях катализируемых ими процессов. Пероксидаза окисляет полифенолы и некоторые ароматические амины. Многие органические соединения,

реагируя с кислородом воздуха, образуют пероксиды. Например, хинон, образующийся при окислении полифенола кислородом воздуха, может существовать как в хиноидной, так и в перекисной форме. Особенно легко пероксиды образуются при окислении кислородом воздуха соединений, имеющих непредельные связи между двумя атомами углерода: терпенов, ненасыщенных жирных кислот, каротиноидов. Пероксиды этих соединений под действием пероксидазы окисляют полифенолы. Многочисленные фенолы, аминфенолы и некоторые аминокислоты подвергаются дегидрированию.

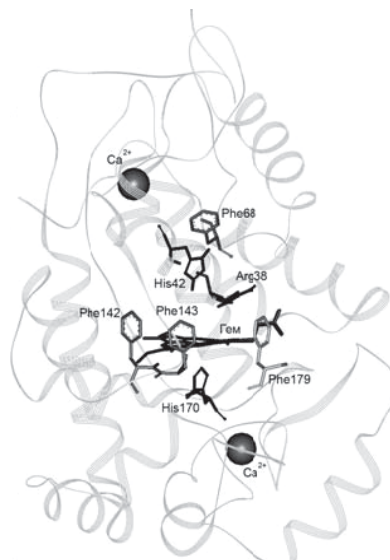


Рис 1. Общий вид молекулы пероксидазы хрена со стороны входа в активный центр, формируемого четырьмя остатками фенилаланина [2]

Многообразие субстратов позволяет предположить, что в реакциях пероксидазного окис-

ления могут реализовываться различные механизмы действия фермента [7, 8].

Ингибиторами фермента является целый комплекс соединений: натрий азид, цианин, L-цистеин, бихромат, этилентеиомочевина, гидроксил-амин, сульфиды, ванадат, *п*-аминобензойная кислота, Cd^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} [9, 10].

Целью настоящей работы явилось изучение кинетики реакции пероксидазного окисления *о*-дианизидина перекисью водорода в присутствии тиолов.

Основная часть. В работе использовали *о*-дианизидин марки «ч» («Реахим», Россия), пероксидазу хрена со спектральным показателем чистоты $E_{403} / E_{278} = RZ = 0,45$.

Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически при $\lambda = 403 \text{ нм}$ ($\epsilon = 10,2 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Известно, что концентрированные растворы пероксидазы окрашены в коричневый цвет и имеют характерные полосы поглощения при 403, 498, 548, 583 и 640 нм. Наиболее интенсивная полоса наблюдается при 403 нм (полоса Core) [3].

Концентрацию перекиси водорода («Реахим», Россия) определяли спектрофотометрически при $\lambda = 230 \text{ нм}$ ($\epsilon = 72,7 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) [11].

Физиологический раствор (0,1 мМ) – 0,18 г NaCl растворяли в 20,0 см³ воды.

Растворы *о*-дианизидина необходимых концентраций готовили в этаноле по навеске.

Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду.

Конечные концентрации реагентов в разных сериях экспериментов указаны в подписях к рис. 2–4.

Реакции окисления *о*-дианизидина перекисью водорода проводили при 20°C в физиологическом растворе.

В кварцевую кювету ($l = 1,0 \text{ см}$) последовательно вносили 2,0 см³ физиологического раствора, 0,1 см³ спиртового раствора *о*-дианизидина и 0,3 см³ раствора пероксидазы. Реакцию инициировали добавлением 0,1 см³ перекиси водорода. Кинетические кривые регистрировали при непрерывном перемешивании на спектрофотометре SPECORD M40 (Carl Zeiss, ГДР) по изменению экстинкции при 460 нм ($\epsilon = 3,0 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) [11].

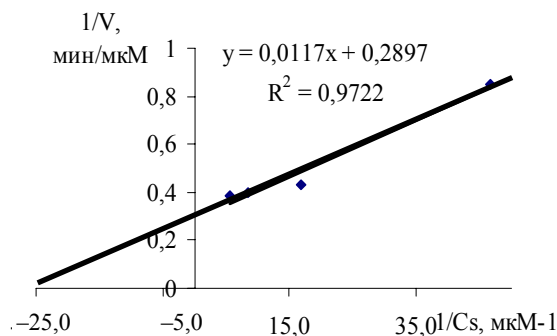
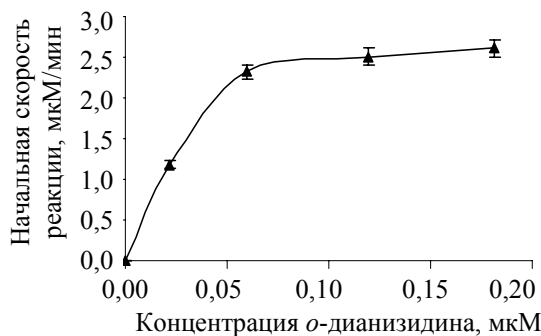


Рис. 2. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления *о*-дианизидина от его начальной концентрации (а); б – то же в координатах Лайнуивера-Берка.

Условия: 20°C; pH 6,1; 0,05 мМ перекись водорода; 0,06 мкМ активных центров пероксидазы

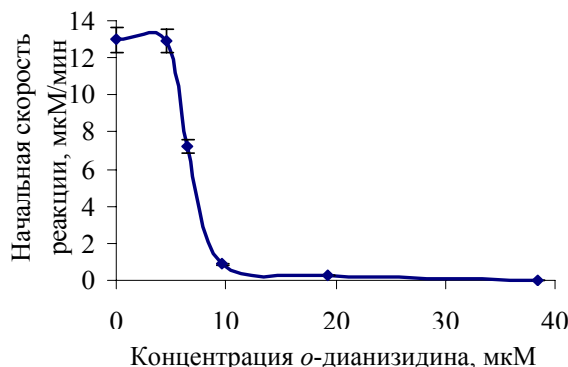
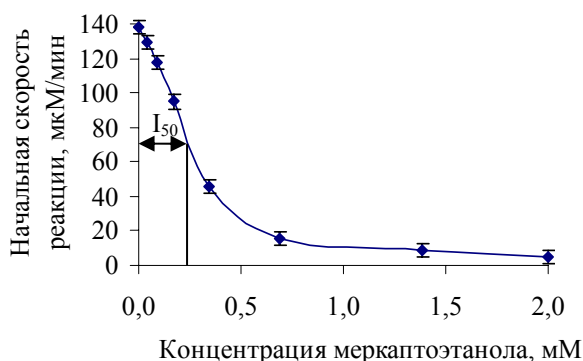


Рис. 3. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления *о*-дианизидина от концентрации β-меркаптоэтанола.

Условия: 20°C; pH 6,1; 0,15 мМ перекись водорода; 0,09 мкМ активных центров пероксидазы; 0,09 мкМ *о*-дианизидин

Рис. 4. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления *о*-дианизидина от концентрации ДЭТ.

Условия: 20°C; pH 6,1; 0,003 мМ перекись водорода; 0,07 мкМ активных центров пероксидазы; 0,12 мМ *о*-дианизидин

При изучении влияния тиолов на скорость протекания реакции в кварцевую кювету вносили 0,1 см³ раствора β-меркаптоэтанола или дитиоэритритола (ДЭТ) определенной концентрации.

Начальные скорости реакции определяли как тангенс угла наклона касательной к началу кинетической кривой. Расчет проводили с помощью пакета программ «Kinetics» спектрофотометра SPECORD M40 (Carl Zeiss, ГДР).

Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления *o*-дианизидина от его начальной концентрации представлена на рис. 2, *a*.

Лианеризация кривой в координатах Лайнуивера-Берка (рис. 2, *б*) позволяет сделать вывод о том, что пероксидазное окисление *o*-дианизидина пероксидазой подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Установлено, что константа Михаэлиса (K_m) этой реакции составляет 0,04 мкМ, а максимальная скорость реакции (V_{max}) – 3,3 мкМ/мин. Полученные значения согласуются с литературными данными [8].

Дальнейшая работа была направлена на изучение влияния тиолов на скорость протекания ферментативной реакции окисления *o*-дианизидина пероксидазой хрена (рис. 3).

Установили, что скорость реакции ингибируется на 50% (I_{50}) при концентрации ингибитора (β-меркаптоэтанола), равной 250,0 мкМ [12], и концентрации ДЭТ – 7,0 мкМ (рис. 4).

Заключение. Выполнены кинетические исследования окисления *o*-дианизидина перекисью водорода, катализируемого пероксидазой хрена с показателем оптической чистоты $RZ = 0,45$. Установлено, что $K_m = 0,04$ мкМ и $V_{max} = 3,3$ мкМ/мин.

Изучено влияние β-меркаптоэтанола и ДЭТ на ферментативное окисление *o*-дианизидина. Реакция пероксидазного окисления *o*-дианизидина ингибируется на 50% при концентрациях ингибиторов 250,0 мкМ (β-меркаптоэтанол) и 7,0 мкМ (ДЭТ).

Исследования позволили подтвердить возможность использования пероксидаз для окисления тиолов.

Литература

1. Александрова, Е. Ю. Изучение пероксидазной активности в экстрактах из корневища и корней хрена и ее стабильность к различным воздействиям / Е. Ю. Александрова, М. А. Орлова, П. Л. Нейман // Вестн. моск. ун-та. – 2006. – Т. 47, № 5. – С. 350–352.

2. Газарян, И. Г. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений / И. Г. Газарян, Д. М. Хушпулюян, В. И. Тишков // Успехи биол. химии. – 2006. – Т. 46. – С. 303–322.

3. Иванова, Т. М. О природе фенолоксидазного действия пероксидазы / Т. М. Иванова,

Б. А. Рубин // Биохимия. – 1962. – Т. 27, № 4. – С. 622–630.

4. Карамышев, А. В. Колориметрическое определение пероксидазной активности в присутствии полианиона / А. В. Карамышев, Т. В. Ступникова, И. Ю. Сахаров // Журн. аналит. химии. – 2008. – Т. 63, № 1. – С. 36–39.

5. Григоренко, В. Г. Получение, свойства и применение рекомбинантной пероксидазы хрена: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 03.00.23 / В. Г. Григоренко; Моск. госуд. ун-т им. М. В. Ломоносова. – М., 2001. – 26 с.

6. Алпеева, И. С. Анионные пероксидазы и их применение в биоанализе: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 02.00.15, 03.00.23 / И. С. Алпеева; Моск. госуд. ун-т им. М. В. Ломоносова. – М., 2007. – 27 с.

7. Рогожина, Т. В. Исследование активного центра и механизма действия пероксидазы с помощью функционально активных веществ: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04 / Т. В. Рогожина; Якут. госуд. сельскохоз. акад. – Саратов, 2005. – 21 с.

8. Лебедева, О. В. Влияние никотинамидадениндинуклеотида на кинетику реакции пероксидазного окисления ферроцианида калия / О. В. Лебедева // Вестн. моск. ун-та. – 2000. – Т. 41, № 3. – С. 195–198.

9. Карасева, Е. И. Пероксидазное окисление 3, 3', 5, 5'-тетраметилбензидина в присутствии 2, 4-динитрозорезорцина и полисульфанов резорцина и 2, 4-динитрозорезорцина / Е. И. Карасева, Ю. П. Лосев, Д. И. Метелица // Биоорган. химия. – 2002. – Т. 28, № 2. – С. 147–155.

10. Ферментативное определение ингибиторов пероксидаз и алкогольдегидрогеназ различного происхождения / Т. Н. Шеховцова [и др.] // Химия и компьютер. моделирование. [Электронный ресурс]. – 2002. – Режим доступа: http://chem.kstu.ru/butlerov_comm/vol3/cda5/data/jchem&cs/russian/n9/appl9/analit2001/pdf/1ach2.pdf. – Дата доступа: 15.01.2010.

11. Лебедева, О. В. Кинетическое изучение реакции окисления *o*-дианизидна перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена / О. В. Лебедева, Н. Н. Угарова, И. В. Березин // Биохимия. – 1977. – Т. 42, № 8. – С. 1372–1379.

12. Буткевич, О. Г. Кинетика пероксидазной реакции окисления *o*-дианизидина перекисью водорода в присутствии β-меркаптоэтанола / О. Г. Буткевич, Е. А. Флюрик // Наука – шаг в будущее [Электронный ресурс]: материалы 3-й науч. конф. студентов, магистрантов и аспирантов факультета «Технология органических веществ». – Минск, 3–4 дек. 2009 г. / Белорус. гос. технол. ун-т. – Минск, 2009. – С. 19–20. – Электрон. дан. (17 Мб). – Минск, 2009 г. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

Поступила 26.03.2010