



УДК 577.152.111*17.037

СТАЦИОНАРНАЯ КИНЕТИКА СОВМЕСТНОГО ОКИСЛЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ФЕРРОЦИАНИДА КАЛИЯ ПЕРЕКИСЬЮ ВОДОРОДА В ПРИСУТСТВИИ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

© 1999 г. В. В. Рогожин[#], В. В. ВерхотуровЯкутская государственная сельскохозяйственная академия,
677018, Якутск, ул. Крестильникова, 15

Поступила в редакцию 06.11.97 г. Принята к печати 13.03.98 г.

Изучена стационарная кинетика совместного окисления аскорбиновой кислоты и ферроцианида калия перекисью водорода, катализируемого пероксидазой хрена. В интервале рН 5–7 определены величины k_{cat} и K_m . Показано, что при совместном окислении аскорбиновой кислоты и ферроцианида калия наблюдается ингибирование пероксидазного окисления ферроцианида аскорбиновой кислотой, в то время как сам ферроцианид активует его окисление. Предложена кинетическая схема реакции.

Ключевые слова: пероксидаза хрена; аскорбиновая кислота; ферроцианид калия.

Пероксидаза хрена (КФ 1.11.1.7) катализирует окисление неорганических и органических соединений в присутствии перекиси водорода. По скорости окисления субстраты можно условно разделить на быстро окисляемые (*o*-дианизидин, гидрохинон, *n*-крезол и т.д.) и медленно окисляемые (аскорбиновая кислота, NADH, люминол, ферроцианид и т.д.). Пероксидаза принимает участие в процессах лигнификации, фотосинтеза и регуляции роста растений [1]. Обладая широкой субстратной специфичностью, пероксидаза способна катализировать окисление многих ароматических, гетероциклических и хлорорганических веществ, принадлежащих ныне к числу наиболее опасных загрязнителей среды [2]. При совместном окислении перекисью водорода в присутствии пероксидазы двух субстратов наблюдаются эффекты их взаимного влияния на процесс, что имеет важное значение для понимания механизма действия фермента, широко используемого в качестве метки в иммуноферментном анализе [3, 4] и при исследовании физиологически активных веществ [5].

В литературе имеется множество примеров субстрат-субстратной активации пероксидазы, т.е. ускорения окисления медленно окисляемого субстрата быстро окисляемым [6]. Однако практически отсутствуют сведения по стационарной кинетике совместного окисления ею двух медленно окисляемых субстратов, к которым относятся ферроцианид калия и аскорбиновая кислота. К то-

му же в ряде работ приводятся противоречивые данные о механизме катализируемого пероксидазой хрена окисления ферроцианида калия [7–9]. Его относят к группе субстратов, для которых возможен непосредственный контакт с гемом фермента [7, 8], хотя известно, что при значениях рН, близких к нейтральным, гемин в пероксидазе недоступен даже для малых ионов из раствора [6]. Высказываются предположения, что широкую субстратную специфичность пероксидазы можно объяснить в рамках представления о ферменте как белке-проводнике, имеющем несколько разных каналов электронного транспорта с субстратов, контактирующих с поверхностью его белковой глобулы, на железу гема. Некоторые из этих каналов транспорта электронов могут включать и порфириновый макроцикл [9]. Изучение совместного пероксидазного окисления ферроцианида и аскорбиновой кислоты позволит определить участки связывания этих двух медленно окисляемых субстратов на поверхности белковой глобулы фермента и объяснить механизмы их окисления.

Цель настоящей работы – изучение индивидуального и совместного окисления двух медленно окисляемых субстратов пероксидазы – ферроцианида калия и аскорбиновой кислоты, и определение механизмов их взаимной активации и ингибирования методами стационарной кинетики.

Характер зависимости начальной скорости окисления аскорбиновой кислоты от ее концентрации в двойных обратных координатах (рис. 1, кривая 2) показывает существование активации пероксидазы субстратом при его высоких концентрациях, обусловленной связыванием в активном

Сокращения: АА – аскорбиновая кислота; Fc – ферроцианид калия.

[#] Автор для переписки (факс: (4112) 26-49-49; тел.: (4112) 25-84-79).

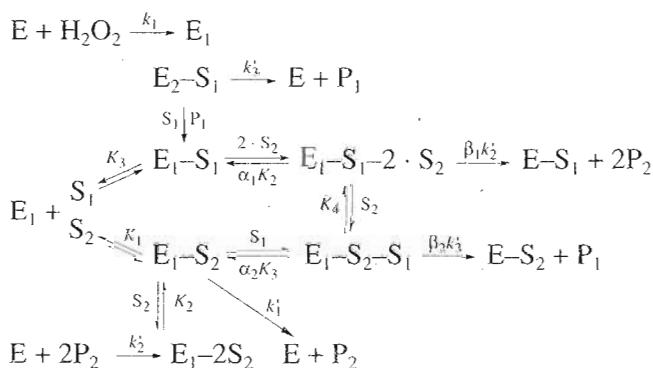
Величины каталитических констант пероксидазного окисления Fc и AA

pH	K_1 , мкМ	K_2 , мкМ	K_3 , мкМ	K_4 , мкМ	k'_1 , с ⁻¹	k'_2 , с ⁻¹	k'_3 , с ⁻¹	α_1	β_1	α_2	β_2
5.0	9.7	340	—	—	17.6	—	260	0.23	3.9	—	—
5.5	10.8	170	370	0.003	6.8	38	220	0.11	3.3	3.8	2.4
6.0	6.1	190	200	0.009	8.4	24	150	0.18	1.6	5.5	2.3
7.0	11.5	230	330	0.016	3.7	17	40	0.21	4.7	4.4	2.7

центре фермента двух молекул аскорбиновой кислоты [10]. Совместное окисление двух субстратов позволило установить активирующее влияние ферроцианида калия на пероксидазное окисление аскорбиновой кислоты (рис. 1, кривая 1)*. При значениях pH 5–6 получены аналогичные зависимости. Показано, что активация окисления аскорбиновой кислоты в присутствии ферроцианида калия имеет смешанный характер (рис. 2). Точка пересечения пучка прямых в координатах Лайнуивера–Берка, соответствующих различным концентрациям ферроцианида, находится в левом верхнем квадранте.

Постоянные α_1 , α_2 , β_1 и β_2 определяли при pH 5–7 путем построения графика в координатах $K_m/(K_m - K_{m(каж)})$, $1/[K_4Fe(CN)_6]$ и $V/(V_{каж} - V)$, $1/[K_4Fe(CN)_6]$ (рис. 3) [11]. Величины α_1 и β_1 равны 0.11–0.23 и 1.6–4.7 соответственно (таблица). Таким образом, связывание ферроцианида облегчает связывание аскорбиновой кислоты, ускоряя при этом ее окисление. Мы изучили также и влияние аскорбиновой кислоты на окисление ферроцианида калия, катализируемое пероксидазой хрена (рис. 4) [12]. Видно, что график имеет вид семейства прямых с общей точкой пересечения в правом верхнем квадранте. Аскорбиновая кислота понижает скорость пероксидазного окисления ферроцианида, ингибируя фермент по смешанному типу, оказывая влияние как на связывание ферроцианида с ферментом, так и на скорость его превращения. Константу ингибирования определяли методом Диксона. Величины α_2 и β_2 больше единицы (таблица). Аскорбиновая кислота лучше связывается с пероксидазой, чем ферроцианид калия [6]. Таким образом, предварительное связывание одной молекулы аскорбиновой кислоты будет затруднять последующее связывание ферроцианида. Однако связывание с ферментом двух молекул аскорбиновой кислоты полностью ингибирует пероксидазное окисление ферроцианида.

Для объяснения кинетики совместного окисления ферроцианида калия и аскорбиновой кислоты предложена следующая схема:



E, E_1, E_2 – нативная и окисленные формы фермента, S_1 – ферроцианид калия, S_2 – аскорбиновая кислота, $E_1 - S_1, E_1 - S_2, E_2 - S_1, E_1 - 2S_2$ – комплексы окисленных форм пероксидазы с субстратами, $E_1 - S_2 - S_1, E_1 - S_1 - 2S_2$ – комплексы окисленных форм фермента с ферроцианидом и одной или двумя молекулами аскорбиновой кислоты, K_1, K_2, K_3, K_4 – константы диссоциации соответствующих комплексов окисленных форм ферментов с суб-

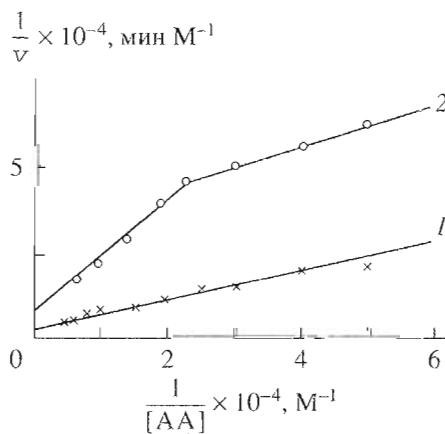


Рис. 1. Зависимости начальных скоростей пероксидазного окисления AA от ее концентрации в координатах Лайнуивера–Берка в присутствии (1) и в отсутствие (2) Fc. Концентрации: пероксидазы – 0.2 мкМ, H_2O_2 – 0.64 мМ, AA – 20–240 мкМ, Fc – 88 мкМ, pH 7.0. Регистрация при 265 нм.

* В отсутствие фермента изменение поглощения при 265 нм не наблюдалось.

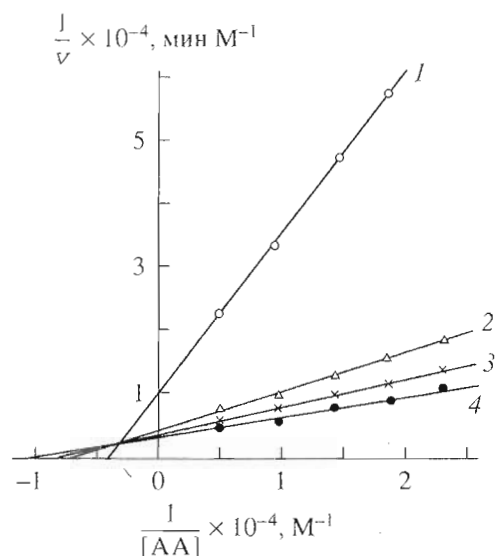


Рис. 2. Зависимости начальных скоростей пероксидазного окисления АА от ее концентрации в координатах Лайнуивера–Берка при концентрациях Fc: 0 (1), 20 (2), 40 (3), 60 (4) мкМ; концентрации: пероксидазы – 0.1 мкМ, H_2O_2 – 0.64 мМ, АА – 44–176 мкМ; рН 5.0.

стратами (ферроцианидом и аскорбиновой кислотой), k_1 , k'_1 , k'_2 , k'_3 – каталитические константы.

Учитывая взаимное влияние в процессе пероксидазного окисления ферроцианида и аскорбиновой кислоты можно предположить, что выявленные эффекты обусловлены близким расположением участков связывания обоих субстратов в активном центре пероксидазы. Окисление ферроцианида может происходить при непосредственном контакте с гемом [13], тогда как при окислении аскорбиновой кислоты реализуются периферийные механизмы переноса электронов, и активный центр фермента в этом случае включает функциональные группы белка [6]. Предполагаемое близкое расположение участков связывания этих медленно окисляемых субстратов, по-видимому, может сказываться на их пероксидазном окислении. Преимущественное окисление доноров водорода, возможно, обусловлено конформационными перестройками в соединениях E_1 и E_2 , предварительное связывание с которыми ферроцианида улучшает последующее связывание и превращение двух молекул аскорбиновой кислоты.

Наблюдаемый эффект субстрат-субстратной активации и ингибирования в реакциях, катализируемых пероксидазой, обусловлен взаимной конкуренцией субстратов. При этом ингибирование либо имеет конкурентный характер, либо связано с дифференцированным окислением субстратов в присутствии пероксидазы. При совместном окислении аскорбиновой кислоты и ферроцианида наблюда-

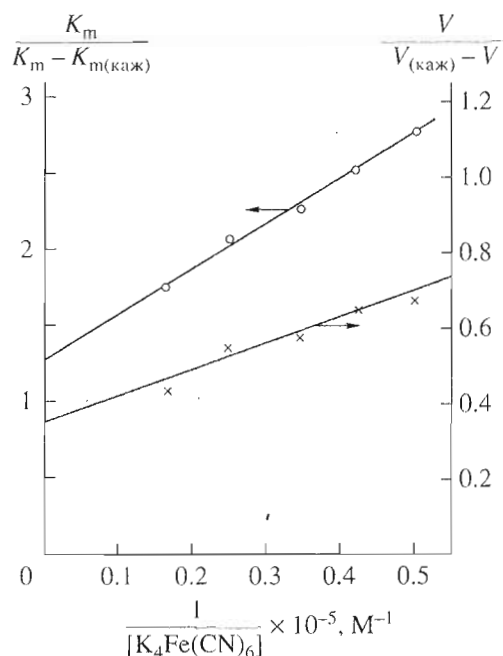


Рис. 3. Определение величин α и β в реакциях пероксидазного окисления АА в присутствии Fc. Условия те же, что на рис. 2.

ется ингибирование пероксидазного окисления ферроцианида аскорбиновой кислотой, в то время как сам ферроцианид активует ее окисление.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использовали пероксидазу хрена (Reanal, Венгрия) со спектральным показате-

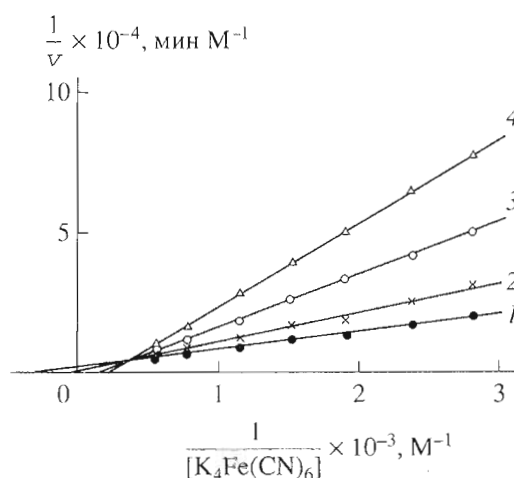


Рис. 4. Зависимости начальных скоростей пероксидазного окисления Fc от его концентрации в координатах Лайнуивера–Берка в присутствии АА в концентрациях: 0 (1), 80 (2), 160 (3), 240 (4) мкМ; концентрации: пероксидазы – 0.4 мкМ, H_2O_2 – 0.64 мМ, Fc – 0.22–1.74 мМ; рН 7.0.

лем чистоты RZ 1.0. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически (ϵ 100 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) [14] и по пиридингемохромогену [15]. В качестве субстрата применяли аскорбиновую кислоту (Serva, Германия). Концентрацию перекиси водорода ("Реахим", Россия) определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции при 230 нм 72.7 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [16]. Остальные реактивы соответствовали квалификации ос. ч.

Реакцию окисления АА (2.2–352.0 μM) перекисью водорода (0.64 mM) проводили при 25°C в 0.1 М Na-ацетатном (рН 4.0–6.0) или Na-фосфатном (рН 6.0–8.0) буфере при концентрации пероксидазы хрена 0.1–0.4 μM . Совместное окисление аскорбиновой кислоты (20–240 μM) и ферроцианида калия (0.02–1.74 mM) инициировали перекисью водорода (0.64 mM). Кинетические кривые окисления аскорбиновой кислоты регистрировали по уменьшению поглощения при 265 нм (ϵ 7000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [17]), а окисление ферроцианида калия при 420 нм (ϵ 1050 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [12]). Спектральные измерения выполняли на двухлучевом спектрофотометре DMS 100 S (Varian, США). За единицу активности фермента принимали количество μM аскорбиновой кислоты или ферроцианида калия, окисленных в условиях реакции за 1 мин. Каталитические константы и кажущиеся константы Михаэлиса реакций окисления аскорбиновой кислоты и ферроцианида калия определяли из данных по стационарной кинетике [11].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крылов С.Н., Крылова С.М., Рубин Л.Б. // Биохимия. 1993. Т. 58. С. 953–961.
2. Левит М.Н., Шкроб А.М. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. С. 309–344.
3. Albrecht H.O. // Z. Phys. Chem. 1928. В. 136. S. 321–330.
4. Гаврилова Е.М. // Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 3. М.: ВИНТИ, 1987. С. 6–55.
5. Долманова И.Ф., Угарова Н.Н. // Ж. анал. химии. 1980. Т. 35. С. 1597–1639.
6. Угарова Н.Н., Лебедева О.В., Савицкий А.П. Пероксидазный катализ и его применение. М.: Изд-во МГУ, 1981.
7. Савицкий А.П., Плотичина Е.В., Угарова Н.Н. // Биоорганическая химия. 1979. Т. 5. С. 1390–1394.
8. Савицкий А.П., Угарова Н.Н., Березин И.В. // Биоорганическая химия. 1979. Т. 5. С. 1843–1853.
9. Лебедева О.В., Угарова Н.Н. // Изв. АН. Сер. хим. 1996. № 1. С. 25–32.
10. Рогожин В.В., Верхотуров В.В. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 1686–1690.
11. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс хим. и ферментативной кинетики. М.: Изд-во МГУ, 1976.
12. Chance B. // Science. 1949. V. 109. P. 204–208.
13. Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. // Биохимия. 1981. Т. 46. С. 1202–1209.
14. Ogawa S., Shira Y., Morishima I. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1979. V. 90. P. 674–678.
15. Falk J.E. Porphyrins and metalloporphyrins. Amsterdam: Elsevier, 1964.
16. George P. // Biochem. J. 1953. V. 54. P. 267–276.
17. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1981. С. 99.

The Steady-State Kinetics of Hydrogen Peroxide Cooxidation of Ascorbic Acid and Potassium Ferrocyanide Catalyzed by Horseradish Peroxidase

V. V. Rogozhin[#] and V. V. Verkhoturov

Yakutsk State Agricultural Academy, ul. Krasil'nikova 15, Yakutsk, 677018 Russia

The steady-state kinetics of hydrogen peroxide cooxidation of ascorbic acid and potassium ferrocyanide catalyzed by horseradish peroxidase was studied. The values of k_{cat} and K_m were determined at pH 5–7. In the cooxidation of ascorbic acid and potassium ferrocyanide, the peroxidase oxidation of ferrocyanide is inhibited by ascorbic acid, whereas ferrocyanide itself activates the oxidation of ascorbic acid. The kinetic scheme of the reaction was suggested.

Key words: horseradish peroxidase, ascorbic acid, potassium ferrocyanide

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (4112) 25-8479; fax: +7 (4112) 26-4949.