



УДК 541.183:577.152.111*17.03

ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ. III. ВЛИЯНИЕ НЕИОННЫХ ПАВ

© 2000 г. А. И. Давлетшин, В. В. Егоров[#]

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина,
109472, Москва, ул. Скрябина, 23

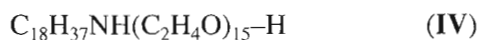
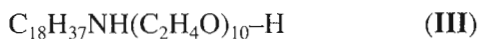
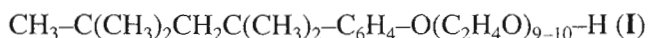
Поступила в редакцию 13.01.2000 г. Принята к печати 27.03.2000 г.

Исследовано влияние ряда неионных поверхностно-активных веществ на начальную скорость перекисного окисления 5-аминосалициловой кислоты в присутствии пероксидазы хрена в растворе. С ростом концентрации ПАВ эта скорость сначала возрастает, потом снижается, далее вновь возрастает и опять снижается. Первичное возрастание может быть вызвано изменением свойств реакционной среды под влиянием ПАВ, последующее снижение – ингибированием фермента, вторичное повышение можно объяснить изменением его конформации и увеличением доступности активного центра для субстрата в результате иммобилизации белка в ассоциатах ПАВ, а вторичное снижение – экранированием белка такими ассоциатами.

Ключевые слова: пероксидаза хрена; неионные ПАВ.

ВВЕДЕНИЕ

Неионные поверхностно-активные вещества (НПАВ) относятся к группе мягких детергентов. Известны примеры как ингибирующего, так и активирующего воздействия таких соединений на ферменты [2–4]. Вместе с тем в литературе отсутствуют систематические исследования влияния НПАВ различного строения на белки. Целью настоящей работы было изучение поведения гемсодержащей пероксидазы из корней хрена в растворе в присутствии неионных ПАВ (I)–(IV) в широком диапазоне их концентраций.



РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из зависимостей начальной скорости перекисного окисления 5-аминосалициловой кислоты от концентрации ПАВ с высокой (I)–(IV) или низкой поверхностной активностью – алифатических спиртов (рис. 1 и 2) видно, что для всех соединений, кроме изопропанола, кривые состоят из

четырёх участков: начального возрастания, снижения, вторичного увеличения и последующего уменьшения скорости реакции.

Начальное возрастание скорости ферментативной реакции мы предположительно связываем с изменением свойств реакционной среды при растворении в ней НПАВ. Это изменение может приводить к частичной дегидратации белка и/или к потере им углеводного фрагмента, осуществляющего защитные функции [5]. Как следствие, может изменяться конформация белка и его активность. В пользу нашего предположения может свидетельствовать активация белка в разбавленных водно-спиртовых растворах (рис. 2, кривые 1 и 3).

Снижение скорости ферментативной реакции на втором участке может быть результатом адсорбции НПАВ в гидрофобном кармане белка в районе его активного центра с последующим экранированием последнего (конкурентное ингибирование [1, 6, 7]). В пользу этого свидетельствует тот факт, что чем выше гидрофобность и поверхностная активность ПАВ, тем раньше наблюдается этот эффект. Прямым свидетельством связывания НПАВ в области активного центра является увеличение скорости перекисного окисления соединения (I) более чем в три раза при добавлении пероксидазы (по данным хемилюминесценции).

Следует отметить, что эффект первичного ингибирования слабо выражен для ПАВ, имеющих значительную по размеру гидрофильную (II) или гидрофобную (I) группу в молекуле, что затруд-

Сообщение II см. [1].

Сокращения: ПАВ – поверхностно-активное вещество; НПАВ – неионное ПАВ.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 377-89-58).

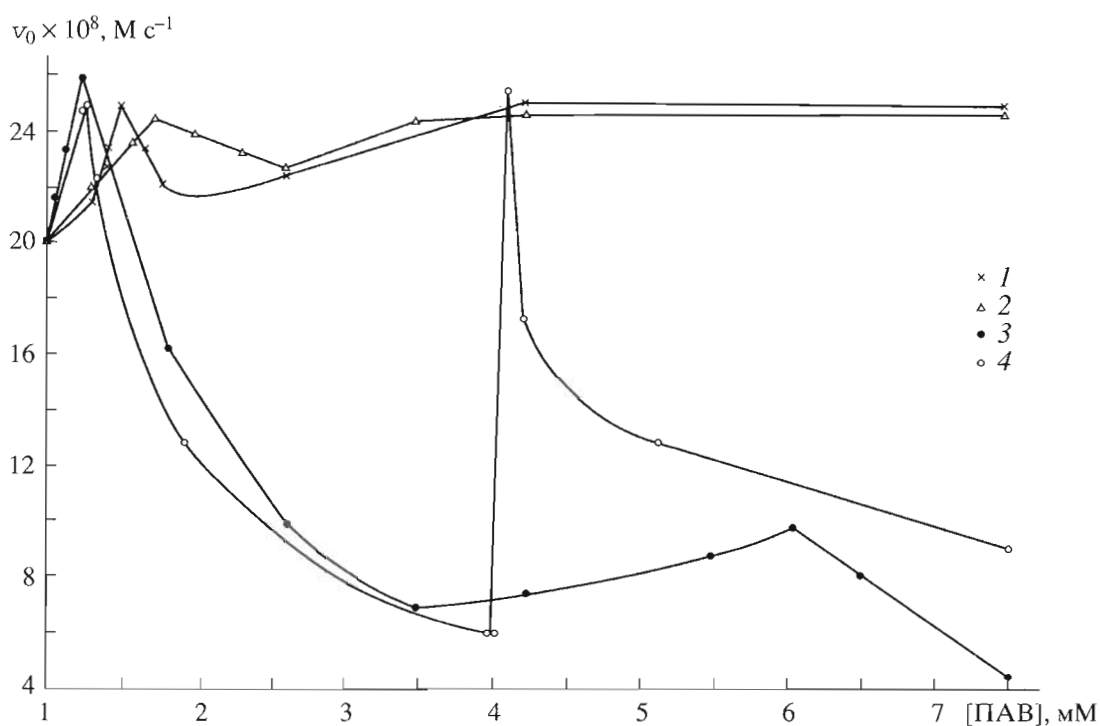


Рис. 1. Зависимость скорости пероксидазного окисления 5-аминосалициловой кислоты от концентрации ПАВ: I (1), II (2), III (3), IV (4).

$[E] = 3 \times 10^{-8}$ M, $[H_2O_2] = [S] = 3$ mM (pH 7.2; 20°C).

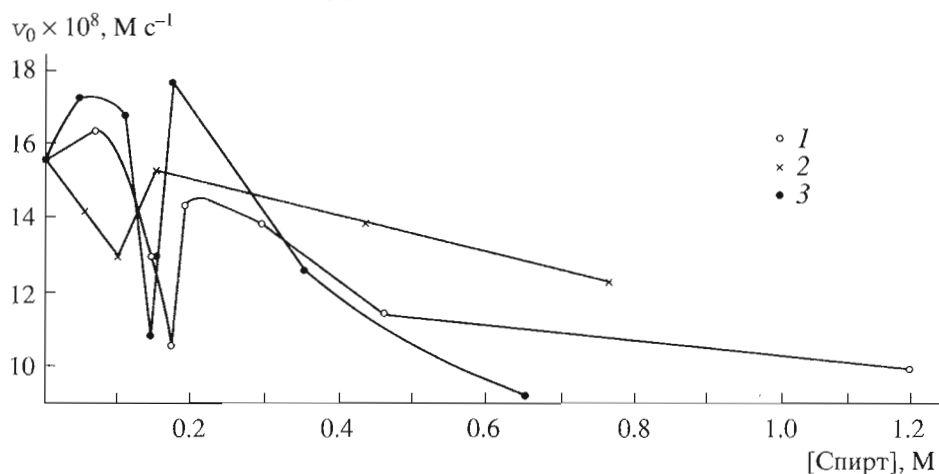


Рис. 2. Зависимость скорости пероксидазного окисления 5-аминосалициловой кислоты от концентрации этанола (1), изопропанола (2), бутанола (3). Условия – см. в подписи к рис. 1.

няет их адсорбцию в гидрофобном кармане белка, а также для низкомолекулярных спиртов, обладающих низкой поверхностной активностью.

Вторичное увеличение ферментативной активности наблюдается для всех соединений и может быть результатом иммобилизации белка в ассоциатах ПАВ с последующим изменением его конформации и увеличением доступности активного центра для субстрата. Эти факторы подро-

но обсуждаются в наших предыдущих публикациях [1, 8]. Образование ассоциатов (мицелл) НПАВ в данной области их концентраций подтверждается тензиометрическим методом, а иммобилизация в них белка – с помощью изотерм сжатия смешанных монослоев пероксидазы с поверхностно-активными веществами на границе вода–воздух (рис. 3). Видно, что добавление пероксидазы к монослою ПАВ (I) приводит к его расширению

(сдвиг вправо кривой 3 по ср. с кривой 1) и увеличению прочности (давление коллапса увеличивается с 22 до 26 мН/м). Эти данные указывают на встраивание белка в монослой НПАВ.

Необходимо отметить, что концентрация ПАВ, соответствующая появлению третьего участка, тем ниже, чем выше гидрофобность ПАВ, т.е. чем раньше начинается образование его ассоциатов в растворе [8].

Вторичное снижение скорости ферментативной реакции может быть результатом, например агрегации ассоциатов НПАВ. В этом случае фермент, включенный в такие агрегаты, может быть экранирован от субстрата, т.е. эффект аналогичен конкурентному ингибированию, наблюдаемому на втором участке. В пользу такой трактовки свидетельствует тот факт, что при добавлении субстрата этот эффект уменьшается.

Указанный эффект практически отсутствует в случае ПАВ (I) и (II), имеющих в составе молекулы относительно небольшую гидрофобную (I) или значительную гидрофильную часть (II), т.е. более гидрофильных по сравнению с (III) и (IV), что может, по-видимому, препятствовать агрегации их ассоциатов. С такой трактовкой согласуется тот факт, что для ПАВ (I) сведения об образовании вторичных ассоциатов в литературе отсутствуют.

Для алифатических спиртов в области их максимальных концентраций в растворе активность фермента снижается практически до нуля. Это может свидетельствовать в пользу другого механизма снижения активности белка в данной области, а именно, в пользу денатурации белка в концентрированных водно-спиртовых растворах, известной из литературы [5].

Обнаруженные в работе эффекты во многом аналогичны наблюдавшимся ранее для ионогенных ПАВ [1, 8]. Это свидетельствует об универсальности механизма воздействия поверхностно-активных веществ, независимо от их природы, на интегральные белки в растворе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы НПАВ (I) – промышленный препарат “Тритон X-100” и соединения (II)–(IV), синтезированные в Научно-исследовательском институте органических продуктов и красителей и содержащие менее 1% примесей по данным ^1H -ЯМР.

Этиловый, изопропиловый и бутиловый спирты марки “ч. д. а.”; калиевые соли фосфорной кислоты (“ч.”); 5-аминосалициловая кислота (“х. ч.”); пероксидаза хрена (Reanal) использованы без до-

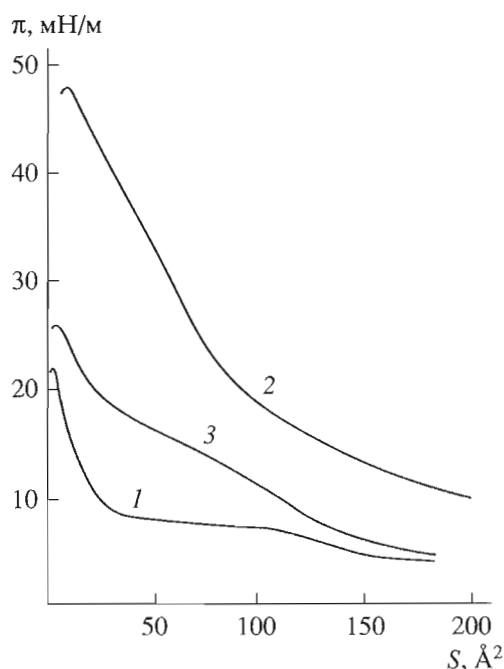


Рис. 3. Изотермы “поверхностное давление–площадь на молекулу” на границе вода–воздух для монослоев: I (1), пероксидазы (2) и смешанного монослоя пероксидазы – I (1 : 50) (3) (pH 7.4; 20°C).

полнительной очистки; вода дважды дистиллирована.

Использованные в работе методы описаны в работе [8].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Давлетишин А.И., Калабина Н.А., Зайцев С.Ю., Егоров В.В. // Биооргани. химия. 1998. Т. 24. С. 430–432.
2. Smith A.T., Santama N., Dacey S., Edwards M., Bray R.C., Thorneley R.N., Burke J.F. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 13335–13343.
3. Gazaryan I.G., Savelyev S.V., Fechina V.A., Veryovkin A.N., Egorov A.M., Ortlepp S.A. // Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases / Ed. J. Lobarzewski. Geneve. univ., 1991. P. 55–58.
4. Ortlepp S.A., Pollard-Knight D., Chiswell D.J. // J. Biotechnol. 1989. V. 11. P. 353–354.
5. Газарян И.Г. // Итоги науки и техники. Биотехнология. 1992. Т. 36. С. 28–53.
6. Dean W., Tanfold Ch. // Biochemistry. 1978. V. 17. P. 9.
7. Dawson R.M.C., Elliot D.C., Elliot W.H., Jones K.M. // Data for Biochemical Research. Oxford: Clarendon Press, 1986. P. 234.
8. Давлетишин А.И., Егоров В.В., Зубов В.П. // Биооргани. химия. 1988. Т. 24. С. 426–432.

Effect of Surfactants on Peroxidase Activity. III. Effect of Nonionic Surfactants

A. I. Davletshin and V. V. Egorov[#]

Skryabin State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, ul. Skryabina 23, Moscow, 109472 Russia

The effect of a series of nonionic surfactants on the initial rate of the peroxide oxidation of 5-aminosalicylic acid in solution catalyzed by horseradish peroxidase was studied. As the surfactant concentration increases, the peroxidation rate first increases, then decreases, and the increase/decrease cycle is repeated. The primary increase may be induced by a change in properties of the medium under the action of surfactants, and the following decrease, by the enzyme inhibition. The secondary increase may be explained by a change in the enzyme conformation and an increase in the accessibility of its active site for the substrate due to the immobilization of the protein in the surfactant aggregates, whereas the secondary decrease, by a shielding of the protein with these aggregates.

Key words: horseradish peroxidase, nonionic surfactants

[#] *To whom correspondence should be addressed; phone +7 (095) 377-8958.*

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 8. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.