

УДК 577.151.4
ГРНТИ 62.39.51
02.00.15

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ОКИСЛЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ПЕРОКСИДАЗОЙ ХРЕНА ХРОНОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Тихонов Б.Б., Стадольникова П.Ю., Сидоров А.И., Сульман Э.М.,
Матвеева В.Г.

ФГБОУ ВО «Тверской государственной технической университет»
Кафедра Биотехнологии и химии

В статье проведено сравнение кинетических параметров окисления органических соединений свободной и иммобилизованной пероксидазой хрена хронометрическим и стандартным методами. Свободная пероксидаза хрена была извлечена из сердцевины корня *Arctostaphylos uva-ursi*. Иммобилизация пероксидазы хрена проводилась на модифицированной хитозаном и глутаровым диальдегидам ионообменной смоле КУ 2-8; модифицированном соляной кислотой, 3-аминопропилтриэтоксисиланом, хитозаном и глутаровым диальдегидом диоксиде титана; микросферах альгината натрия и хитозана. Сравнение показало, что в большинстве случаев хронометрический метод дает более высокие значения начальных скоростей реакции и более точно характеризует деятельность каталитического центра пероксидазы, чем стандартный метод.

Ключевые слова: пероксидаза хрена, окисление, кинетика, хронометрический метод

DOI 10.26456/vtchem2019.1.15

Определение кинетических параметров ферментативных процессов – это сложный и неоднозначный процесс, базирующийся на фундаментальных закономерностях протекания химических реакций и анализе целого ряда влияющих факторов. В простейшем случае зависимость скорости ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата описывается гиперболической функцией - уравнением Михаэлиса [1, с. 87]:

$$V = \frac{V_m \cdot C}{K_M + C}, \quad (1)$$

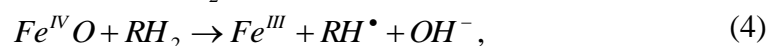
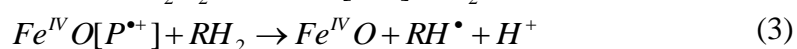
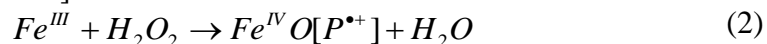
где V_0 – начальная скорость реакции; V_m – предельная скорость реакции при бесконечно большой концентрации субстрата; K_M - константа Михаэлиса; C – начальная концентрация субстрата.

Константу Михаэлиса (K_m) и предельную скорость реакции (V_m) определяют обычно линеаризацией уравнения Михаэлиса-Ментен (метод Лайнуивера-Берка) по начальной скорости реакции (V_0) при варьировании начальной концентрации субстрата (C), при этом

эффективность фермента определяется величиной соотношения V_m/K_M [1, с. 90]. Однако подавляющее большинство ферментативных реакций состоят из нескольких последовательных стадий, включающих, в частности, образование фермент-субстратного комплекса и большого числа промежуточных соединений, в связи с чем описание кинетики процесса существенно усложняется, что позволяет получить лишь приближенные значения кинетических параметров, отражающие параметры лимитирующей стадии процесса, которая не всегда является собственно каталитической.

Для более точной оценки каталитических параметров некоторых ферментов существуют специальные методы. Одним из таких методов является хронометрический метод определения кинетических параметров пероксидазы, основанный на восстановлении аскорбиновой кислотой или ее солями свободных радикалов, как только они образуются в реакции [2, с. 334].

Пероксидаза (К.Ф. - 1.11.1.7; донор: пероксид водорода оксидоредуктаза) – фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий окисление органических соединений перекисью водорода. Он представляет собой гликопротеин с молекулярным весом около 40 кДа, содержащий феррипорфирин в качестве простетической группы гема [3, с. 252]. Механизм реакции, катализируемой пероксидазой, хорошо изучен и включает 3 стадии (так называемый «механизм Шанса-Джорджа») [4, с. 203]:



где $P^{\bullet+}$ - порфириновый радикал; RH_2 - органический субстрат; RH^{\bullet} - органический радикал – продукт реакции.

В каталитическом цикле участвуют 2 молекулы ароматического субстрата (RH_2) и 1 молекула пероксида, продуктами реакции являются свободные радикалы RH^{\bullet} , которые могут самопроизвольно взаимодействовать между собой с образованием олигомерных продуктов хиноновой структуры, чаще всего нерастворимых в воде и легко удаляемых из реакционной среды [5, с. 260]. При этом реакция (3) происходит гораздо медленнее, чем реакция (2), и соответственно, является лимитирующей стадией процесса [6, с. 22294].

Целью данного исследования было сравнение кинетических параметров окисления органических соединений свободной и иммобилизованной пероксидазой хрена хронометрическим и стандартными методами.

Реактивы

Пероксидаза хрена была получена из сердцевины корня хрена обыкновенного (*Armoracia rusticana*) по стандартной методике [7 с. 65]. Субстраты для исследования кинетики: фенол, о-дианизидин и пирокатехин (все 0 Sigma-Aldrich); фосфатный буферный раствор на основе KH_2PO_4 и NaOH ($\text{pH}=7,0$); перекись водорода (ООО «Росбио», 3%-ый раствор). Компоненты для иммобилизации пероксидазы хрена: катионит КУ 2-8 (ООО "Химимпэкс"); диоксид титана (TiO_2 , ООО «ЛДХим»); соляная кислота (HCl , ЗАО «Купавнареактив»); хитозан низкой вязкости (Fluka); альгинат натрия (Sigma-Aldrich); глутаровый диальдегид (25 %, Acros Organics); 3-Аминопропилтриэтоксисилан (Sigma-Aldrich). Для хронометрического метода использовался аскорбинат натрия (Sigma-Aldrich).

Иммобилизация пероксидазы хрена

Иммобилизация пероксидазы хрена проводилась на нескольких типах носителей по описанным ранее методикам: на модифицированной хитозаном и глутаровым диальдегидам ионообменной смоле КУ 2-8 [7, с. 67]; модифицированном соляной кислотой, 3-аминопропилтриэтоксисиланом, хитозаном и глутаровым диальдегидом диоксиде титана [8, с. 100]; микросферах альгината натрия и хитозана [9, с. 183].

Методика проведения кинетических экспериментов

Изучение кинетики осуществлялось в термостатируемом реакторе периодического действия с возвратно-поступательным качанием при интенсивности перемешивания 300 мин^{-1} для исключения внешнедиффузионного торможения. Реакции со свободным ферментом проводились в кювете спектрофотометра СФ-2000. За ходом реакций наблюдали по увеличению оптической плотности реакционной смеси при $\lambda = 440 \text{ нм}$ (раствор сравнения – вода). Начальная скорость реакции (V_0) стандартным методом определялась графически из зависимости концентрации продуктов реакции (полученной из первичных экспериментальных данных по молярным коэффициентам поглощения) от времени. Определение начальной скорости реакции (V_0) хронометрическим методом проводилось с помощью добавления в реакционную среду аскорбината натрия в концентрации 1 ммоль/л и определения времени τ (так называемое время лаг-фазы – время с начала реакции до начала роста оптической плотности реакционной смеси), которое необходимо для полного расходования аскорбиновой кислоты в реакции восстановления свободных радикалов. V_0 определяется по формуле:

$$V_0 = \frac{2 \cdot C_A}{\tau}, \quad (5)$$

где C_A – начальная концентрация аскорбината натрия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было проведено определение кинетических параметров реакций окисления фенола, пирокатехина и о-дианизидина стандартным и хронометрическим методами свободной и иммобилизованной 4 способами пероксидазы хрена. На Рис. 1 представлен пример первичных экспериментальных данных зависимости оптической плотности реакционной смеси в окислении фенола и пирокатехина свободной пероксидазой хрена при длине волны 440 нм от времени.

Как видно на графиках, некоторое время после начала реакции (время τ) оптическая плотность не растет, после чего реакция начинает идти в обычном режиме.

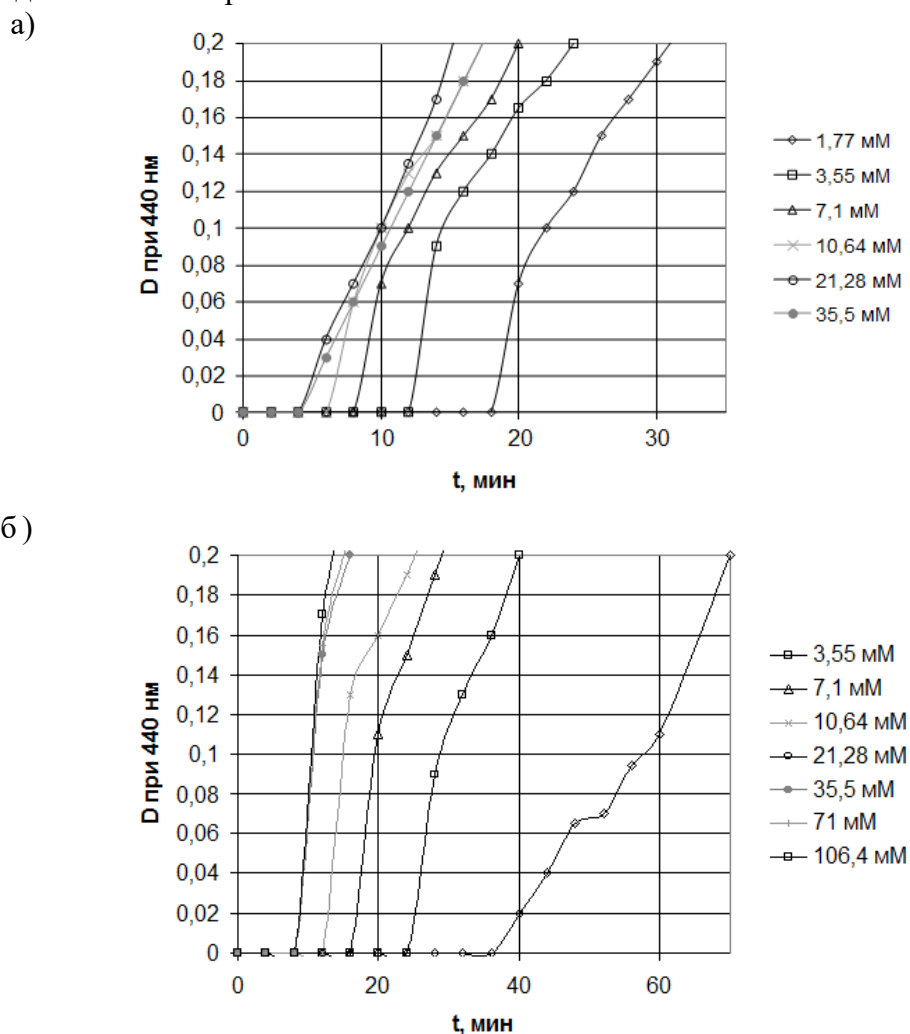


Рис. 1. – Ход реакций окисления фенола (а) и пирокатехина (б) различных начальных концентраций перекисью водорода в присутствии аскорбината натрия свободной пероксидазой хрена ($\text{pH} = 6,5$, $t = 25^\circ\text{C}$)

Для свободной пероксидазы хрена и всех ее иммобилизованных препаратов были определены значения времени τ в реакциях окисления фенола, пирокатехина и о-дианизидана (начальная концентрация субстратов – 10,64 мМ), после чего из начальной концентрации аскорбината натрия по формуле (5) были рассчитаны значения начальной скорости реакций. Для сравнения также были рассчитаны значения начальной скорости реакций стандартным методом (линеаризацией уравнения Михаэлиса). Результаты проведенных экспериментов приведены в таблице 1.

Таблица 1
Кинетические параметры проведенных экспериментов

Катализатор	Субстрат	Начальная скорость реакции (v_0), ммоль/л·с, $\cdot 10^3$	
		традиционный метод	хронометрический метод
Свободная пероксидаза	фенол	4,9	5,5
	пирокатехин	9,7	10,1
	о-дианизидин	9,8	9,8
КУ 2-8 - пероксидаза	фенол	1,2	1,4
	пирокатехин	1,7	1,8
	о-дианизидин	1,9	1,1
TiO ₂ - пероксидаза	фенол	1,5	1,8
	пирокатехин	1,8	1,9
	о-дианизидин	1,8	1,8
Альгинат натрия-пероксидаза	фенол	0,9	0,9
	пирокатехин	0,8	0,8
	о-дианизидин	0,6	0,7
Хитозан-пероксидаза	фенол	0,5	0,6
	пирокатехин	0,5	0,6
	о-дианизидин	0,4	0,5

Из таблицы 1 видно, что значения начальных скоростей реакций, рассчитанных хронометрическим методом, очень близки к значениям, полученным традиционным методом, при этом в большинстве случаев хронометрический метод дает более высокие значения скоростей. Это подтверждает представленные выше данные о механизме реакции. Значения начальной скорости, полученные хронометрическим методом реакции, характеризуют именно деятельность каталитического центра пероксидазы, то есть более точно отражают ее эффективность с точки зрения основного функционального назначения.

Было проведено сравнение кинетических параметров окисления органических соединений свободной и иммобилизованной на модифицированной хитозаном и глутаровым диальдегидам ионообменной смоле КУ 2-8; модифицированном соляной кислотой, 3-аминопропилтриэтоксисиланом, хитозаном и глутаровым диальдегидом диоксиде титана; микросферах альгината натрия и хитозана пероксидазой хрена хронометрическим и стандартным методами (линеаризацией уравнения Михаэлиса). Анализ показал, что в большинстве случаев хронометрический метод дает более высокие значения начальных скоростей реакции, что более точно характеризует деятельность каталитического центра пероксидазы.

Авторы благодарят РФФИ (грант № 18-08-00424) и Российский научный фонд (проект № 17-19-01408) за финансовую поддержку исследований.

Список литературы

1. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. М.: Academia. 2005. 480 с.
2. Goodwin D.C., Yamazaki I., Aust S.D., Grover T.A. Determination of rate constants for rapid peroxidase reactions // *Anal. Bioch.* 1995. Vol. 231. P. 333-338.
3. Veitch N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme // *Phytochem.* 2004. Vol. 65. pp. 249–259.
4. Dunford H.B., Stillman J.S. On the function and mechanism of action of peroxidases // *Coord. Chem. Rev.* 1976. Vol. 19. P. 187-251.
5. Klivanov A.M., Tu T.-M., Scott K.P. Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal-conversion wastewaters // *Science.* 1983. Vol. 221. pp. 259–260.
6. Bhattacharyya D.K., Bandyopadhyay U., Banerjee R.K. Chemical and Kinetic Evidence for an Essential Histidine Residue in the Electron Transfer from Aromatic Donor to Horseradish Peroxidase Compound I // *J. of Biol. Chem.* 1993. Vol. 268, No. 30. pp. 22292-22296.
7. Тихонов Б.Б. Разработка и исследование свойств новых каталитических систем окисления фенолов на основе иммобилизованных оксидоредуктаз: дис. ... кандидата химических наук: 02.00.15. Тверь. 2007. 139 с.
8. Тихонов Б. Б., Стадольникова П. Ю., Сидоров А. И., Сульман Э. М. Физико-химические исследования биокатализатора на основе иммобилизованной на модифицированном диоксиде титана пероксидазы хрена // *Бюллетень науки и практики. Электрон. журн.* 2017. №12 (25). С. 98-104
9. Стадольникова П.Ю., Тихонов Б.Б., Сидоров А.И., Сульман Э.М. Иммобилизация оксидоредуктаз на наночастицах природных полимеров // *Актуальная биотехнология.* 2018. № 3 (26). с. 182-185.

DETERMINATION OF KINETIC PARAMETERS OF ORGANIC COMPOUNDS OXIDATION BY HORSE RADISH PEROXIDASE BY THE CHRONOMETRIC METHOD

B.B. Tikhonov, P.Yu. Stadolnikova, A.I. Sidorov, E.M. Sulman, V.G. Matveeva

Tver State Technical University
Department of Biotechnology and Chemistry

In article comparison of kinetic parameters of organic compounds oxidation by the free and immobilized horseradish peroxidase by chronometric and standard methods is carried out. Free horseradish peroxidase has been extracted from a core of the root *Armoracia rusticana*. The immobilization of horseradish peroxidase was carried out on the modified by chitosan and glutaric dialdehyde ion-exchanger KU 2-8; modified by hydrochloric acid, (3-Aminopropyl)triethoxysilane, chitosan and glutaric dialdehyde titanium dioxide; microspheres of sodium alginate and chitosan. Comparison has shown that in most cases the chronometric method gives higher values of initial speeds of reaction and more precisely characterizes activity of the catalytic center of peroxidase, than a standard method.

Keywords: *horseradish peroxidase, oxidation, kinetics, chronometric method*

об авторах:

ТИХОНОВ Борис Борисович – доцент, кандидат химических наук, доцент кафедры Стандартизации, сертификации и управления качеством ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», tiboris@yandex.ru

СТАДОЛЬНИКОВА Полина Юрьевна – аспирант ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», p.stadolnikova@mail.ru

СИДОРОВ Александр Иванович - профессор, кандидат химических наук, профессор кафедры Биотехнологии и химии ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», sidorov@science.tver.ru

СУЛЬМАН Эсфирь Михайловна - профессор, доктор химических наук, заведующая кафедрой Биотехнологии и химии ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», sulman@online.tver.ru

МАТВЕЕВА Валентина Геннадьевна - профессор, доктор химических наук, профессор кафедры Биотехнологии и химии ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», valen-matveeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 11 декабря 2018 года