

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 26 (65). 2013. № 1. С. 300-305.

УДК 577.152.193

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ ПОДЛОЖКИ НА СУБСТРАТНУЮ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ РЕДЬКИ ЧЕРНОЙ

Вяткина О.В.

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: oksana_yyatkina@list.ru*

В статье приведены результаты кинетических исследований в системах с иммобилизованной пероксидазой редьки черной и субстратами-восстановителями различной природы. Определены эффективные кинетические параметры изучаемых окислительных процессов и средняя молярная активность фермента относительно гидрохинона и тиосульфата натрия. Показано, что ферментативная активность зависит от механизма связывания фермента с подложкой.

Ключевые слова: пероксидаза, черная редька, бентонит, силикагель, гидрохинон, тиосульфат натрия.

ВВЕДЕНИЕ

Иммобилизация ферментов на неподвижной матрице сегодня широко используется в науке и технологии для формирования высокочувствительных биологических сенсоров и промышленных катализаторов. Основная проблема получения иммобилизованных ферментных препаратов заключается в том, что использование одного и того же метода в качестве стандартной процедуры приводит в случае различных ферментов к резким отличиям в их активности, стабильности, субстратной специфичности. Кроме того, характеристики конечных иммобилизованных ферментных препаратов существенным образом зависят от способа выделения и очистки исходного образца фермента и природы носителя.

Поэтому нашей целью было исследование влияния природы подложки на каталитическую активность иммобилизованной пероксидазы редьки черной относительно субстратов различной природы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась пероксидаза корнеплодов редьки черной, экстрагированная фосфатным буфером (рН=6,8) из измельченного растительного сырья [1]. В качестве подложки для иммобилизации фермента были использованы: силикагель, синтезированный из силикатного клея при взаимодействии с 6М соляной кислотой и природный бентонит Асканит (Грузия). Иммобилизацию ферментного

препарата, выделенного из корнеплода редьки черной, на подложках проводили методом сорбции [2]. В качестве субстратов-восстановителей использовали гидрохинон и тиосульфат натрия, субстрата-окислителя – пероксид водорода. Активность ферментных препаратов определяли по начальной скорости окисления субстратов-восстановителей в течение 10 мин. Остаточные концентрации тиосульфата в системе контролировали иодиметрически [3], гидрохинона – фотоколориметрическим методом по реакции с о-фенантролином в присутствии Fe^{3+} [4]. За единицу активности принимали количество окисленного субстрата (мкМ), катализированное 1 мл ферментного препарата в течение 1 мин. Также критерием активности фермента считали степень его конверсии в исследованных системах

$$\alpha = \frac{C_n - C_k}{C_n} \cdot 100\% \quad (1)$$

Где: C_n – начальная концентрация субстрата восстановителя в системе; C_k – конечная концентрация субстрата восстановителя в системе.

Эффективные кинетические параметры: порядок ($n_{эф}$) и константу скорости реакции ($k_{эф}$) определяли графическим методом в координатах Вант-Гоффа. Для расчета максимальной скорости ферментативной реакции (w_{max}) и константы Михаэлиса (K_m) использовали координаты Лайнуивера–Берка. Исследования проводились в системах 1–6, состав которых указан в табл. 1.

Таблица 1
Состав исследованных систем ($\tau=10$ мин, $t=25$ °С, $pH=6,8$)

№	Окислитель	Восстановитель	Катализатор	Цель исследования
1	—	$C(Na_2S_2O_3)$ от 0,01 до 0,1 моль/л	бентонит	Изучение сорбции тиосульфата на бентоните
2	$C(H_2O_2)=$ 0,02 моль/л	$C(Na_2S_2O_3)$ от 0,01 до 0,1 моль/л	бентонит	Определение кинетических параметров $k_{эф}$, $n_{эф}$
3		$C(C_6H_4(OH)_2)=0,005$ моль/л	иммобилизованная на силикагеле пероксидаза $m=2,5; 5; 7,5$ г	Определение средней молярной активности фермента \bar{A}
4		$C(Na_2S_2O_3)=0,04$ моль/л		
5		$C(Na_2S_2O_3)=0,04$ моль/л	иммобилизованная на бентоните пероксидаза $m=2,5; 5; 7,5$ г	
6		$C(C_6H_4(OH)_2)$ от 0,0001 до 0,001 моль/л	иммобилизованная на силикагеле пероксидаза $m=5$ г	Определение кинетических и каталитических параметров $k_{эф}$, $n_{эф}$, w_{max} , K_m , α
7		$C(Na_2S_2O_3)$ от 0,01 до 0,1 моль/л		
8		$C(Na_2S_2O_3)$ от 0,01 до 0,1 моль/л	иммобилизованная на бентоните пероксидаза $m=5$ г	

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика пероксидазного окисления электронодонорного субстрата – $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ и протондонорного субстрата – $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$ изучалась в сложных многокомпонентных системах, где в качестве подложки для иммобилизации фермента использовали пористые материалы с высокой сорбционной способностью и проявляющие каталитическую активность в системах с пероксидом водорода. Поэтому для интерпретации полученных результатов в таблице 2 приведены ранее нами установленные кинетические параметры окисления тиосульфата натрия и гидрохинона пероксидом водорода в различных системах, включающих в себя отдельные компоненты исследуемых систем (2–8).

Таблица 2
Кинетические параметры окисления $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ и $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$ пероксидом водорода в исследованных системах

Объект	Субстрат / № системы	$k_{эф}$	$n_{эф}$	W_{max} , моль/л·с	K_m , моль/л	\bar{A} , е.а.
катализатор отсутствует	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ [5]	$2,2 \cdot 10^{-5}$	0,4			
	$\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$ [6]	$0,1 \cdot 10^{-6}$	0,6			
система с бентонитом (пероксидаза отсутствует)	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ / (2)	$3,1 \cdot 10^{-6}$	0,2			
	$\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$ [6]	$1,5 \cdot 10^{-6}$	0,8			
нативная пероксидаза	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ [5]	$6,3 \cdot 10^{-4}$	≈ 1	$2,4 \cdot 10^{-5}$	$2,7 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \pm 0,2$
	$\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$ [7]	$1,1 \cdot 10^{-4}$	≈ 1	$4,1 \cdot 10^{-6}$	$0,7 \cdot 10^{-2}$	$0,1 \pm 0,01$
иммобилизованная на силикагеле пероксидаза	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ / (4,7)	$3,3 \cdot 10^{-4}$	≈ 1	$3,7 \cdot 10^{-5}$	$6,4 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \pm 0,1$
	$\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$ / (3,6)	$1,7 \cdot 10^{-3}$	≈ 1	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$20 \cdot 10^{-2}$	$0,2 \pm 0,02$
иммобилизованная на бентоните пероксидаза	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ / (5,8)	$2,5 \cdot 10^{-6}$	0,2	$2,3 \cdot 10^{-4}$	$45 \cdot 10^{-2}$	$0,3 \pm 0,01$
	$\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$ [8]	$3,5 \cdot 10^{-2}$	1,5	$1,9 \cdot 10^{-5}$	$2,3 \cdot 10^{-2}$	$0,7 \pm 0,01$

Было установлено, что исследуемый фермент катализирует пероксидазное окисление гидрохинона как в нативной, так и в иммобилизованной форме, о чём свидетельствует увеличение $k_{эф}$ на два порядка в системе с нативной пероксидазой, на три порядка в системе с пероксидазой иммобилизованной на силикагеле и на четыре порядка в системе с пероксидазой иммобилизованной на бентоните по

сравнению с не каталитической системой и системой, где катализатором разложения пероксида водорода являлся бентонит [6].

Причем в системах с иммобилизованной на силикагеле пероксидазой средняя ферментативная активность по отношению к гидрохинону увеличивается в 2 раза, а в системе с комплексом бентонит – пероксидаза в 7 раз по сравнению с нативным ферментом, при этом константа Михаэлиса (K_m) в системе с пероксидазой иммобилизованной на бентоните в 9 раз, а максимальная скорость реакции в 18 раз ниже чем с ферментом иммобилизованным на силикагеле. Такая дифференциация кинетических параметров систем с иммобилизованными пероксидазами объясняется различием механизмов связывания фермента с подложкой. Так, в случае с бентонитом, где сорбция пероксидазы не обратима [2], увеличение скорости окисления гидрохинона пероксидом водорода очевидно связано не только с конформационными изменениями молекулы фермента, приводящими к её активации, но и в увеличении числа каталитических центров за счет активных в отношении H_2O_2 центров бентонита [6]. Об этом свидетельствует дробное значение порядка реакции $n_{эф}=1,5$. Уменьшением концентрации гидрохинона в таких системах за счет сорбции его на подложке можно пренебречь, так как даже на свободной от молекул фермента поверхности минерала она при концентрациях субстрата близких концентрациям насыщения составило менее 0,5% [9].

В системе же с пероксидазой, иммобилизованной на силикагеле, большая часть фермента (70%) при внесении в раствор гидрохинона десорбируется с подложки (что объясняет типичный порядок ферментативной реакции ≈ 1 по субстрату-восстановителю). Увеличение скорости конверсии гидрохинона в такой системе по сравнению с системой, содержащей нативный фермент, обусловлена активацией необратимо связанной с подложкой пероксидазы и сорбцией гидрохинона на силикагеле, вклад в общую конверсию субстрата которой составляет до 3% при концентрациях близких к концентрациям насыщения фермента [10]. Именно сорбционные процессы на подложках приводят к значительному повышению кажущейся K_m иммобилизованных ферментов.

Каталитическое действие пероксидазы относительно тиосульфат-иона наблюдалось только в системах с нативным ферментом и ферментом обратимо сорбированном на силикагеле, где значение кинетических параметров практически идентично (табл. 2). Незначительное увеличение K_m и понижение $k_{эф}$ также обусловлено сорбционными процессами в системе, где вклад сорбции субстрата в общую степень превращения в рассматриваемом диапазоне концентраций составил 3–7%.

В системе же с модифицированным пероксидазой бентонитом основной вклад в уменьшение концентрации $S_2O_3^{2-}$ вносили одновременное каталитическое действие бентонита и сорбционные процессы (рис. 1).

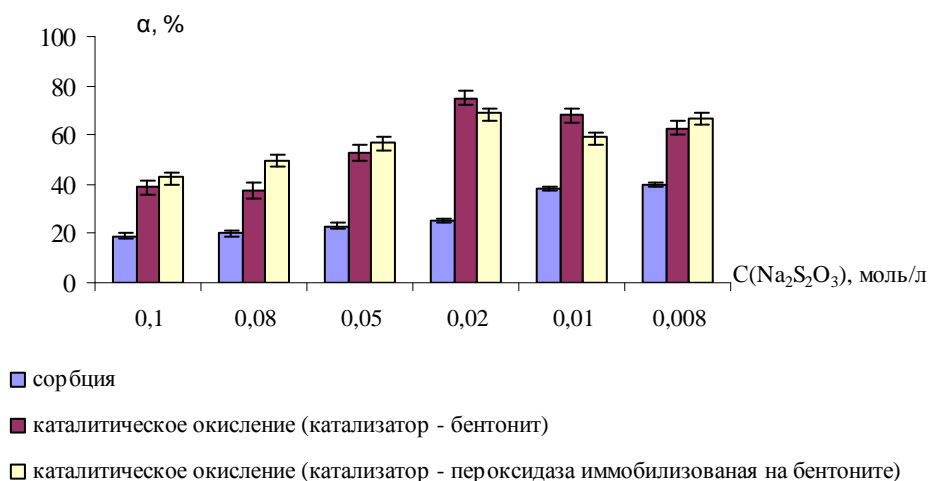


Рис. 1. Степень конверсии Na_2SO_3 в системах 1, 2, 8.

На доминирование каталитического действия природного бентонита над каталитическим действием фермента, нанесённого на бентонит, в системе с сульфат-ионом также указывают близкие значения степеней конверсии в системах 1, 2, 8 и сравнимость эффективных значений порядка реакции и константы скорости. Таким образом, мы показали влияние природы подложки на субстратную специфичность изучаемого фермента.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено, что иммобилизация пероксидазы редьки черной на бентоните и силикагеле увеличивает ее активность в реакции окисления гидрохинона, а повышение ферментной активности относительно тиосульфат-иона происходит только в системе с пероксидазой, иммобилизованной на силикагеле. Во всех случаях иммобилизация фермента приводит к увеличению кажущейся K_m , а, следовательно, к понижению его избирательности.
2. Установлено, что на активность и избирательность иммобилизованной пероксидазы существенное влияние оказывают сорбционные и каталитические в отношении субстратов свойства подложки.

Список литературы

1. Селибер Г.Л. Большой практикум по микробиологии / Г.Л. Селибер. – М.: Мир, 1962. – 492 с.
2. Вяткина О.В. Влияние природы подложки на механизм сорбции пероксидазы редьки черной / О.В. Вяткина // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. – 2012. – Т. 25(64), № 4. – С. 239–247.
3. Аналитическая химия: Учебное пособие для студентов фармацевтических вузов и ф-тов III-IV уровня аккредитации / Под об. Ред. В. В. Болотова; пер. с укр. / В. В. Болотов, О. М. Гайдукевич, О. М. Свечникова и др. – Харьков: Изд-во НФАУ; Золотые страницы, 2001. – 456 с.

4. Лурье Ю.Ю. Химический анализ производственных сточных вод / Ю.Ю. Лурье, А.И. Рыбников. – М.: Химия, 1974. – 395 с.
5. Вяткина О.В. Каталитическая активность пероксидазы редьки черной относительно неорганического субстрата $S_2O_3^{2-}$ / О.В. Вяткина, И.В. Лаврентьева, М.О. Ермакова // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. – 2011. – Т. 24(63), №1. – С. 190–195.
6. Вяткина О.В. Природа кислото-основной и каталитической активности монтмориллонита в водной среде/ О.В. Вяткина, Е.Д. Першина, К.А. Каздобин // Украинский химический журнал. – 2006. – Т. 72, № 7–8. – С.19–24.
7. Першина Е.Д. Природа влияния протона на окислительную активность оксиферментов в водных средах / Е.Д. Першина, О.В. Вяткина // Международная конф. «Прикладная физическая химия и нанохимия»: тезисы докл. – Судак, 2009. – С. 182–183.
8. Ermakova M. Immobilization as a stabilization and regulation method of peroxidase radish black substrate specificity / M. Ermakova, O. Vyatkina // Peer-reviewed articles 8th International Bata Conference for Ph.D. Students and Young Researchers. – 2012. – Vol. 8., № 116. – P. 1–8.
9. Вяткина О.В. Адсорбция и окислительная деструкция фенолов на монтмориллонитах в водных средах в присутствии перекиси водорода / О.В. Вяткина // Украинский химический журнал. – 2006. – Т. 72, №1. – С. 44–47.
10. Вяткина О.В. Каталитическая активность пероксидазы редьки черной иммобилизованной на бентоните в водных системах с гидрохиноном / О.В. Вяткина, И.В. Лаврентьева // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. – 2010. – Т. 23(62), №4. – С. 260–267.

Вяткіна О.В. Вплив природи підкладки на субстратну специфічність іммобілізованої пероксидази чорної редьки / О.В. Вяткіна // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2013. – Т. 26 (65), № 1. – С. 300-305.

У статті наведені результати кінетичних досліджень у системах з іммобілізованою пероксидазою чорної редьки та субстратами-відновниками різної природи. Визначені ефективні кінетичні параметри окиснювальних процесів, що вивчалися, і середня молярна активність ферменту відносно гідрохінону та тіосульфату натрію. Показано залежність між ферментативною активністю та механізмом зв'язування фермент – підкладка.

Ключові слова: пероксидаза, чорна редька, бентоніт, силікагель, гідрохінон, тіосульфат натрію.

Vyatkina O.V. Effect of the nature of the substratum on the substrate specific immobilized black radish peroxidase / O.V. Vyatkina // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2013. – Vol. 26 (65), No. 1. – P. 300-305.

The article presents the results of kinetic studies in systems with immobilized black radish peroxidase and deferent nature reductant-substrates. The effective kinetic parameters of the oxidation processes under study and the average molar activity of the enzyme relative to hydroquinone and sodium thiosulfate were defined. It is shown that the enzyme activity depends from the mechanism of linkage enzyme-substratum.

Keywords: peroxidase, radish black, bentonite, silicagel, hydroquinone, sodium thiosulfate.

Поступила в редакцію 18.02.2013 г.