

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
ДОНЕЦКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ

УЧРЕЖДЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«Донецкая Республиканская Малая Академия Наук учащейся молодёжи»

Отделение: химия

Секция: прикладные химические
технологии

КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЛАККАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ

Работу выполнила:

Грабчак Софья Викторовна,
учащаяся 11 класса

Муниципального
общеобразовательного
учреждения «Лицей «Интеллект»
города Донецка»

Руководитель:

Коротких Людмила Петровна,
учитель химии МОУ «Лицей
«Интеллект» г. Донецка»

Научный консультант:

Одарюк Иван Дмитриевич,
доцент кафедры биохимии и
органической химии

ГОУ ВПО «ДонНУ», к.х.н.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
РАЗДЕЛ 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. ЛАККАЗЫ – МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ ОКСИДАЗЫ.....	4
1.1 Общие сведения о ферментах.....	4
1.2 Уравнение Михаэлиса-Ментен, параметры ферментативной кинетики.....	8
1.3 Оксидазные превращения.....	10
1.4 Лакказы. Источники и механизм действия.....	11
1.5 Радикальные процессы в биосистемах. Окисление фенолов.....	15
РАЗДЕЛ 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	17
2.1 Очистка веществ и приготовление растворов.....	17
2.2 Спектрофотометрический метод анализа.....	18
РАЗДЕЛ 3. КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЛАККАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ (ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ).....	20
ВЫВОДЫ	27
Список литературы.....	28

ВВЕДЕНИЕ

Высокоактивные ферменты с широкой субстратной специфичностью имеют широкие перспективы использования для решения различных биотехнологических задач. Преимущества ферментов перед небелковыми катализаторами – мягкость условий реакции, высокий выход целевых продуктов, возможности регуляции активности обуславливают растущий интерес к ним.

Для промышленного применения ферментов необходимо знание механизмов сложных, многостадийных реакций, которые они катализируют. Это позволяет проводить технологические процессы с максимальной эффективностью и предсказуемым результатом. Многие ферментативные реакции описываются моделью Михаэлиса-Ментен, которая исходит из схемы двухстадийной реакции с образованием фермент-субстратного комплекса и его распада.

Работа посвящена исследованию механизма окисления молекулярным кислородом гидрохинона, аскорбиновой кислоты и ABTS в присутствии лакказы макромицета *Trametes versicolor*. Планируется определить параметры ферментативной кинетики окисления исследуемых субстратов, которые используются при планировании научных опытов и технологических процессов.

РАЗДЕЛ 1

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. ЛАККАЗЫ – МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ ОКСИДАЗЫ

1.1 Общие сведения о ферментах

Человек с древности использовал биотехнологические процессы с участием ферментов, например, при производстве вина, уксуса, хлеба, чая, кисломолочных продуктов. Конечно, это были знания, основанные на опыте, без понимания природы таких процессов. В конце XIX в. было введено понятие ферментов – веществ живых клеток, обладающих каталитическими свойствами и способных также вне биологических объектов сохранять эти свойства. В начале XX в. были выделены в чистом виде первые ферментные препараты - уреаза, пепсин трипсин и химотрипсин и доказано, что они являются белками. [1].

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы. Как и обычные катализаторы, ферменты ускоряют термодинамически возможные реакции и при этом не расходуются. От химических катализаторов ферменты отличаются [2]:

1. намного более высокой эффективностью, чем небелковые катализаторы (ускорение неферментативных реакций в 10^6 - 10^8 раз);
2. специфичностью (катализируют превращение небольшого числа подобных субстратов, или только одного, побочные продукты при этом не образуются);
3. кооперативностью действия – некоторые процессы катализируются не одиночным ферментом, а специальным мультиферментными комплексами (ферменты собраны в близко расположенные группы и действуют сообща);
4. регулируемой активностью, в том числе и на генетическом уровне, с помощью кофакторов и индукторов;

5. мягкостью условий работы – физиологические значения температуры и рН.

В основу классификации ферментов положены катализируемые ими реакции. Существует шесть классов ферментов:

1. Оксидоредуктазы, которые катализируют окислительно-восстановительные реакции;
2. Трансферазы, ускоряющие реакции переноса функциональных групп;
3. Гидролазы, которые осуществляют гидролитический разрыв связей;
4. Лиазы ускоряют разрыв связи негидролитическим путем;
5. Изомеразы - ускоряют реакции изомеризации;
6. Лигаза, которые катализируют синтез веществ с участием АТФ.

Эти классы делятся на соответствующие подклассы и подподклассы с определенной системой нумерации. Подкласс у оксидоредуктаз указывает на природу окисляющейся группы; у трансфераз – транспортируемой группы, у гидролаз - тип гидролизуемой связи, у лиаз – тип связи, подвергающейся разрыву, у изомераз – тип катализируемой реакции изомеризации, у лигаз – тип вновь образуемой связи. Подподкласс у оксидоредуктаз указывает тип акцептора электронов, у трансфераз - тип транспортируемой группы, у гидролаз - тип гидролизуемой связи, а у лиаз – тип отщепляемой группы. У Изомераз он уточняет характер превращения субстрата, а у лигаз – природу образующего соединения. И, наконец, записывается порядковый номер фермента в данном подподклассе. Таким образом, каждому ферменту соответствует шифр из четырех чисел, однозначно определяющий его место в классификации и основную информацию о катализируемой реакции [3]. Например, цифровое обозначение ферментов семейства лакказ – КФ 1.10.3.2.

Многие ферменты существуют в виде изоферментных форм – они катализируют одну реакцию, но имеют отличия в структуре, активности, физико-химическим свойствам, обычно выделяются из разных организмов [1].

Для ферментов характерна наиболее высокая активность в узком интервале условий – температурный и pH оптимумы (рисунок 1.1 и 1.2). Температурный оптимум многих ферментов около 40°C, pH оптимум – среда, близкая к нейтральной.

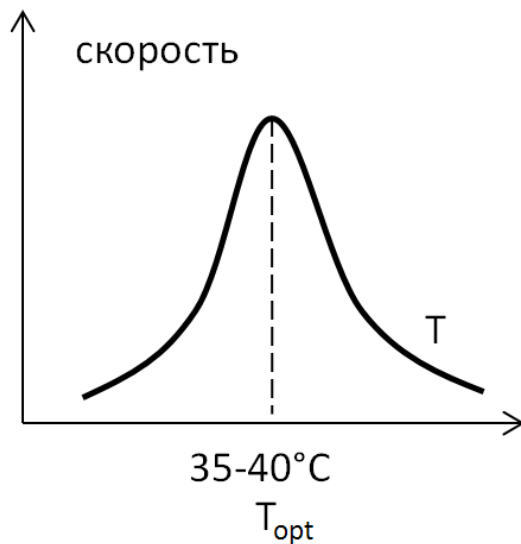


Рисунок 1.1 – Зависимость ферментативной активности от pH среды.

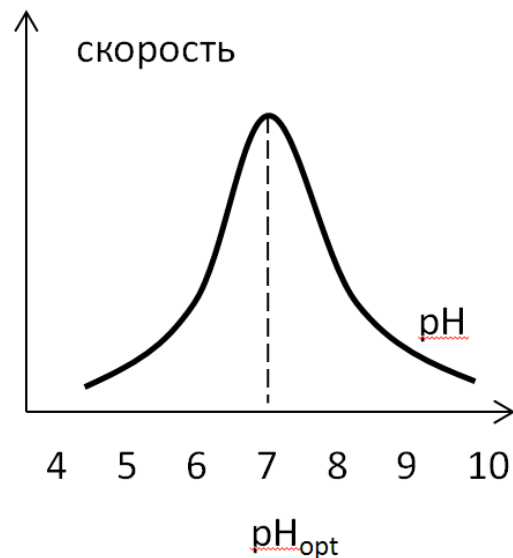


Рисунок 1.2 – Зависимость ферментативной активности от температуры.

Молекулы ферментов, как и всех белков, очень велики. За процесс катализа ответственна небольшая часть молекулы фермента – активный центр, содержащий функциональные группы аминокислот или еще кофактор. Но и вся остальная молекула необходима, чтобы сформировать активный центр, а также часто аллостерические центры. Активный центр геометрически и электростатически соответствует субстрату, который должен с ним связаться. В связи с этим существует две модели взаимодействия фермента и субстрата:

- «ключа и замка» - активный центр сразу строго соответствует пространственной структуре субстрата;

- индуцированного соответствия – активный центр является подвижной структурой, которая частично подстраивается под структуру субстрата (рисунок 1.3) [2].

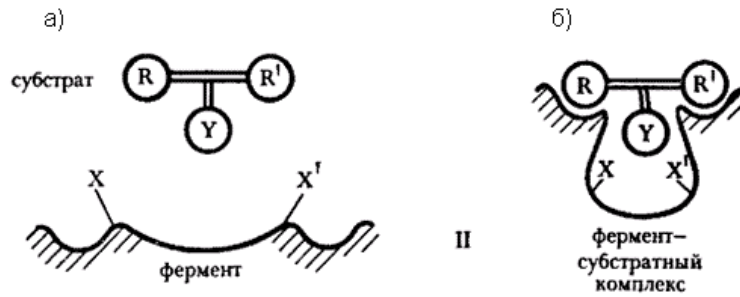


Рисунок 1.3 – Возникновение соответствия между активным центром фермента и субстратом в момент взаимодействия. а) – до связывания; б) – связывание фермента и субстрата в фермент-субстратный комплекс.

По строению ферменты могут быть простыми и сложными белками. Фермент, являющийся сложным белком называют холоферментом. Белковая часть фермента называется апоферментом, небелковая часть – кофактором. Различают два типа кофакторов [4]:

1. Протетическая группа – прочно связана с апоферментом, часто ковалентными связями.

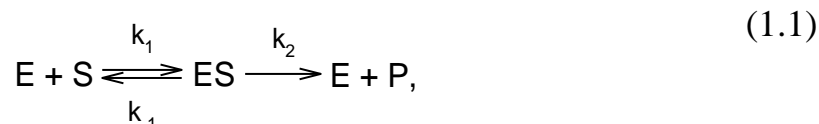
2. Кофермент – небелковая часть, легко отделяемая от апофермента. Часто коферментами служат производные витаминов.

К коферментам относятся следующие соединения:

- производные витаминов;
- нуклеотиды – доноры и акцепторы остатка фосфорной кислоты;
- кофермент, участвующий в переносе электронов и протонов в цепи тканевого дыхания;
- фосфоаденозилфосфосульфат, участвующий в переносе сульфата;
- глутатион, участвующих в ОВР.

1.2 Уравнение Михаэлиса-Ментен, параметры ферментативной кинетики [3], [5].

Для математического описания ферментативной кинетики удобно использовать модель Михаэлиса-Ментен. Ферментативная реакция рассматривается как двухстадийная:



где на первой стадии происходит образование фермент-субстратного комплекса (реакция равновесная – идет одновременная диссоциация этого комплекса), а на второй стадии субстрат, связанный с ферментом, претерпевает превращение и отщепляется.

Уравнение Михаэлиса-Ментен (1.2) описывает зависимость скорости ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата.

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]_0}{K_m + [S]_0}, \quad (1.2)$$

где V_0 – начальная скорость ферментативной реакции при данной начальной концентрации субстрата $[S]_0$, V_{max} – максимальная скорость, к которой стремится скорость реакции при $[S]_0 \rightarrow \infty$, а K_m – константа Михаэлиса – соответствует такой концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна $V_{max}/2$.

График этой зависимости имеет вид кривой с насыщением (рисунок 1.4). Для удобства определения кинетических параметров используют преобразования уравнения Михаэлиса-Ментен, например, линеаризация в двойных обратных координатах уравнения Лайнуивера-Берка:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} \quad (1.3)$$

Из графика, построенного в двойных обратных координатах, можно определить интересующие нас K_m и V_{max} (рисунок 1.5).

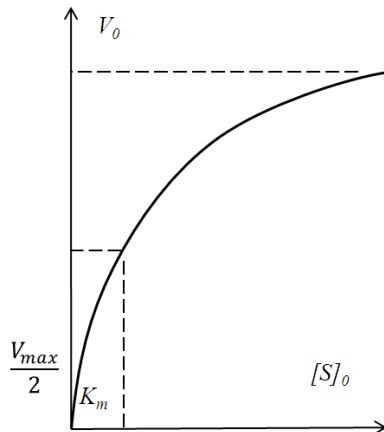


Рисунок 1.4 – Зависимость скорости ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата.

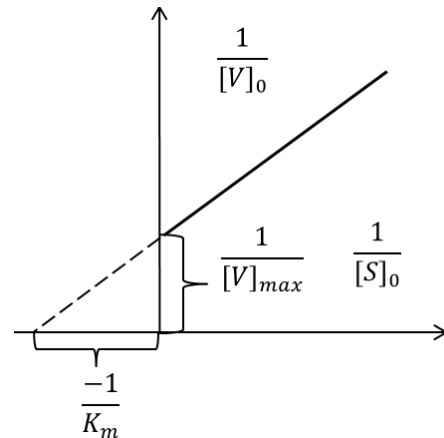


Рисунок 1.5 – Определение параметров K_m и V_{max} с помощью уравнения Лайнуивера-Берка.

Физический смысл постоянных таков. V_{max} равна максимальной скорости – такой, при которой весь фермент участвует в реакции, т.е. находится в состоянии фермент-субстратного комплекса. Понятно, что для разных концентраций фермента будут разные V_{max} и для использования этой величины в качестве меры реакционной способности субстратов необходимо учесть концентрацию фермента. Поэтому вводится каталитическая константа, которая равна константе скорости второй стадии двухстадийного ферментативного процесса (1.1):

$$k_{kat} = k_2 = \frac{V_{max}}{[E]_0} \quad (1.4)$$

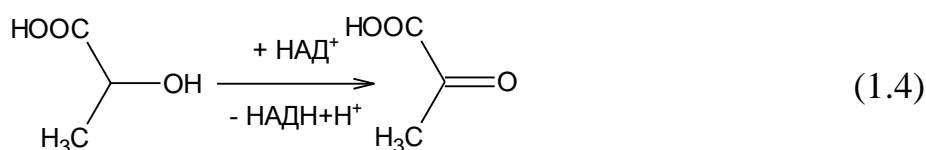
Простые ферментативные реакции, соответствующие схеме (1.1), описываются в рамках рассматриваемой модели с достаточной точностью. Однако значительная часть ферментативных реакций не описывается в рамках

представлений кинетической модели. Кроме того, процесс может осложняться действием активаторов или ингибиторов, протеканием неферментативных реакций и т.д. Заметное отклонение экспериментальных кинетических параметров реакции от расчетных исходя из модели – основание предположить более сложный механизм ферментативного процесса.

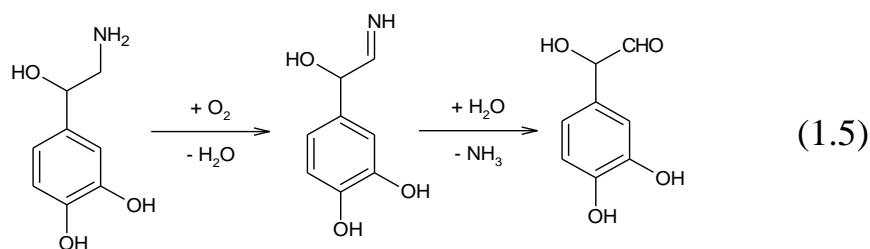
1.3 Оксидазные превращения

Класс оксидоредуктаз включает ферменты, катализирующие реакции между двумя субстратами, из которых один (донор) окисляется, восстанавливая другой (акцептор). Такие реакции лежат в основе биоокисления. Рассмотрим некоторые подклассы оксидоредуктаз [3].

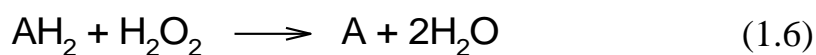
Дегидрогеназы участвуют в процессах, в которых происходит отрыв атома водорода от одного субстрата (окисление) и перенос на другой (восстановление). Фермент гликолиза лактатдегидрогеназа катализирует отщепление атомов водорода от лактата с образованием пирувата (или обратный процесс) по реакции (1.4). Окислителем в этом случае выступает НАД^+ , который является коферментом лактатдегидрогеназы [6]:



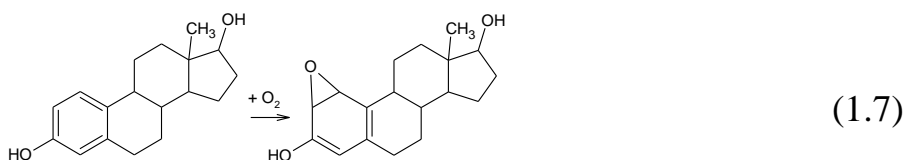
Оксидазы используют в качестве окислителя молекулярный кислород, перенося электроны от субстрата прямо на него. Подразделяются на медьсодержащие (в активном центре содержат атомы меди) и флавиносодержащие (имеют кофактор – производное флавина). Моноаминоксидаза осуществляет окислительное дезаминирование биогенных аминов (адреналин, серотонин, гистамин и др.) по реакции (1.5), что играет важную роль в передаче нервного импульса и детоксикации [6]:



Пероксидазы окисляют субстраты, восстанавливая параллельно пероксид водорода до воды. Участвуют во многих окислительных процессах и входят в состав антиоксидантной защиты организма [3]:



Оксигеназы катализируют включение одного или двух атомов кислорода в молекулу субстрата. Часто такие превращения приводят к образованию более растворимого в воде продукта. Подобные реакции используются организмами для выведения токсинов, биосинтеза некоторых веществ, например, стероидных гормонов [7]:



Оксидоредуктазы используют для отрыва электронов от субстрата атомы металлов, расположенные в активном центре (Cu, Fe, Mn, V) или кофакторы (никотинамидадениндинуклеотид, никотинамидадениндинуклеотидфосфат, флавинадениндинуклеотид, флавиномононуклеотид). Окислителем обычно выступает молекулярный кислород или пероксид водорода [8].

1.4 Лакказы. Источники и механизм действия

Выделяют обширную и разнообразную группу ферментов – голубые медьсодержащие оксидазы, в активном центре которых присутствуют 4 атома меди, образующие 3 центра (один двоянный), различающиеся спектроскопическими характеристиками и ролью в каталитическом акте. Это высокоактивные ферменты, способные окислять множество органических и неорганических субстратов, восстанавливая при этом O_2 до воды без образования активных форм кислорода (реакция 1.8) [9].



Лакказа (*n*-дифенол: кислород оксидоредуктаза, КФ 1.10.3.2) – одна из медьсодержащих голубых оксидаз. Фермент катализирует окисление различных органических соединений: *o*-, *n*-дифенолы, аминифенолы, полифенолы, полиамины, метокси-замещенные фенолы, лигнины и арилдиамины; а также некоторых неорганических ионов, например, $Mo(CN)_8^{4-}$, $Fe(CN)_6^{4-}$, $Os(CN)_6^{4-}$, $W(CN)_8^{4-}$ [9].

Механизм действия лакказ считается аналогичным таковому для всех медьсодержащих оксидаз. За один каталитический цикл от субстрата отщепляется один электрон, за четыре цикла фермент переходит в полностью восстановленную форму (все атомы меди находятся в степени окисления +1) и она выступает восстановителем кислорода. Считается, что вначале фермент отщепляет электроны от четырех окисляемых групп субстрата, а потом восстанавливает кислород в два этапа, по два электрона. На первом образуется пероксидный интермедиат. На втором происходит передача оставшихся двух электронов, а также протонов – образуется вода. Подробный механизм, роль каждого атома меди и их окружения в этом процессе до конца не изучены [10].

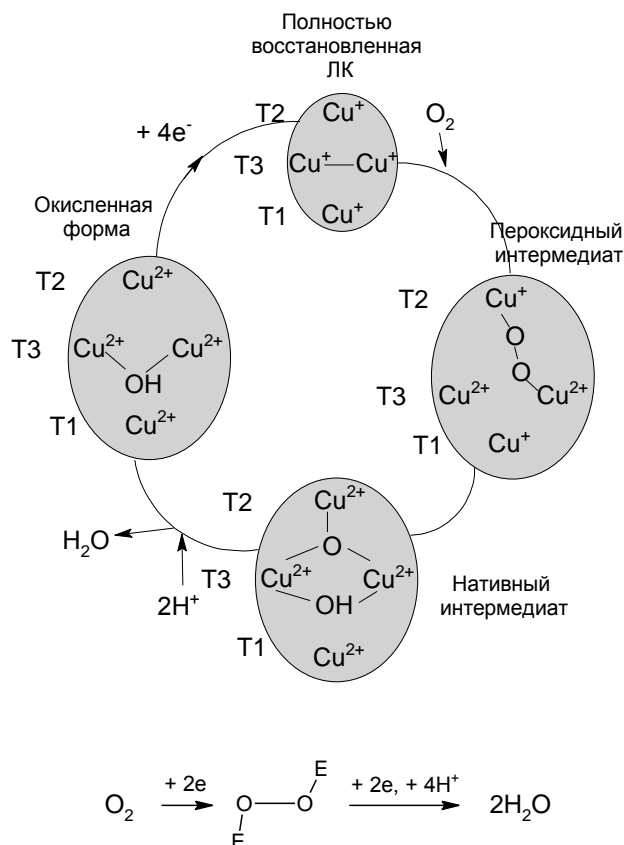


Схема 1.1 – Каталитический цикл лакказы [10].

Впервые лакказа обнаружена в конце 19 века в соке японского лакового дерева *Rhus vernicifera*. На сегодняшний момент их выделяют из разного природного сырья – грибов, растений и бактерий. Известны лакказы насекомых. Грибы, синтезирующие лакказу, известны как базидиомицеты, активно разлагающие древесину. Это обширный класс высших грибов, выделяющих особый комплекс ферментов, предназначенный для разложения основных полимеров древесины – целлюлозы и лигнина. В него входят целлюлазы, гемицеллюлазы, лакказа и ферменты класса пероксидаз. Указывается, что лакказы растений могут катализировать обратный процесс – синтез лигнина. Кроме того, фермент может принимать участие в детоксикации. Ферменты лигнолитического комплекса играют важную роль в деструкции отмершей растительной биомассы, следовательно, в поддержании равновесия природных экосистем. Способность разрушать некоторые

загрязнители техногенного происхождения позволяет использовать фермент для очистки почв, водоемов и др. от них.

Расширяется сфера применения лакказ – они выступают катализаторами в органическом синтезе (в том числе, при получении противораковых препаратов) и в производстве электропроводящих полимеров, используются в пищевой промышленности, биоэнергетике, косметологии и медицине.

Несмотря на разнообразие биообъектов, продуцирующих лакказы, принцип действия ферментов из разных источников схожий, а биохимические свойства (таблица 1.1) довольно близки. Так, большинство лакказ – гликопротеиды, содержащие 10-45% углеводной части, их молекулярная масса 50-70 кДа, оптимум pH находится, как правило, в кислой среде. Фермент устойчив в кислой среде и при нагревании [10], [9].

Таблица 1.1 – Физические и биохимические свойства лакказ из разных источников

Биообъект	M_r , кДа	pH_{opt}	T_{opt} , °C
<i>Coprinus cinereus</i>	58	4.0	60-70
<i>Marasmius quercophilus</i>	65	2.6	80
<i>Pleurotus ostreatus POXC</i>	59	6.0	50-60
<i>Daedalea quercina</i>	69	7.0	55
<i>Magnaporthe grisea</i>	70	6.0	30
<i>Pleurotus ostreatus POXA1w</i>	61	6.0	45-65

В искусственных системах классическими субстратами лакказ являются двухатомные фенолы, окисляющиеся до соответствующих хинонов. В общем случае фермент акцептирует по одному электрону и протону от одной гидроксильной группы субстрата. Образуется радикальный промежуточный интермедиат, который в дальнейшем либо ферментативно окисляется до хинона (схема 1.2) [14], если таковой возможен, либо вступает в неферментативные реакции рекомбинации или полимеризации.

Для решения задач органического синтеза при промышленном использовании фермента необходимы точные сведения о продуктах реакции, их выходе при различных условиях. Экологам, использующим ферментативную биodeградацию отходов, будет важно знать о токсичности и экологической опасности продуктов.

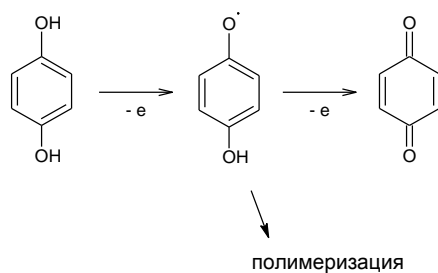


Схема 1.2 – Процесс стадийного одноэлектронного окисления гидрохинона.

1.5 Радикальные процессы в биосистемах. Окисление фенолов

В живых организмах протекает ряд контролируемых ферментами и множество неферментативных (в основном окислительных) процессов по радикальному механизму, приводящих к появлению частиц с неспаренным электроном – свободных радикалов. Многие из них содержат кислород и называются активными формами кислорода – АФК. Как правило, они очень реакционноспособны и нестабильны. Часть из них образуется в контролируемых условиях и необходима для нормальной жизнедеятельности организма (защитная, сигнальная функции), но избыток способен разрушать биомолекулы, вызывать гибель клеток и мутации. Состояние, при котором происходит превышение нормального уровня генерации свободных радикалов, называют оксидативным стрессом, который служит фактором развития многих болезней. Эволюционно выработались механизмы, позволяющие поддерживать нормальный уровень АФК. Они образуют систему антиоксидантной защиты. Важной частью ее являются фенолы, самая

многочисленная группа природных и искусственных антиоксидантов. Фенольные антиоксиданты способны реагировать с АФК с образованием относительно стабильных и безвредных радикалов [13].

Соединения, содержащие фенольные фрагменты, могут обладать в биообъектах различной функциональностью. Это красители, антиоксиданты, сигнальные молекулы – гормоны и нейромедиаторы, аминокислоты и белки [2], [15].

Фенолы давно используются в качестве эффективных промышленных антиоксидантов в олеофазе. Однако в водной среде фенолы претерпевают более сложные, до конца не изученные превращения. В некоторых случаях они могут проявлять не антиоксидантное, а наоборот прооксидантное действие.

Известно несколько путей окисления фенолов. Во-первых, они могут подвергаться автоокислению растворенным молекулярным кислородом. Этот процесс протекает в мягких условиях (комнатная температура, атмосферное давление) и его скорость сильно зависит от структуры фенола и рН среды. От незначительной скорости в слабокислой и нейтральной среде до относительно высокой в сильнокислой и высокой в сильнощелочной. Инициировать окисление фенолов в водной среде способны следы ионов металлов переменной валентности [16]. Окислять фенолы могут некоторые одноэлектронные окислители, к примеру, катион-радикал ABTS (диаммониевая соль 2,2'-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты), традиционно использующийся для определения активности потенциальных антиоксидантов.

В общем случае окисление фенолов начинается с образования феноксильных или семихинонных радикалов, дальнейшие превращения которых зависят от их природы и условий процесса [16].

РАЗДЕЛ 2

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Очистка веществ и приготовление растворов

Исследования проводились с использованием коммерческого препарата лакказы, выделенной из *Trametes Versicolor*, фирмы «SIGMA». Его, как и АВТС (того же производителя, $\geq 98\%$), дополнительно не очищали. Гидрохинон очищали возгонкой. Аскорбиновую кислоту очищали перекристаллизацией из водно-спиртовой смеси. Чистоту веществ подтверждали измерением температур плавления и сопоставлением их с литературными данными, а также спектрофотометрически.

Фосфатный буфер готовили из $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, цитратный – из моногидрата лимонной кислоты и дигидрата цитрата натрия согласно методике, изложенной в [12]. Лимонную кислоту очищали перекристаллизацией из воды, остальные вещества были высокой степени чистоты (≥ 98). рН растворов проверяли с помощью иономера И – 160 М.

Буферные системы готовили на бидистиллированной воде. Субстраты и фермент растворяли также в бидистиллированной воде (или в буферном растворе). Растворы субстратов готовили непосредственно перед опытами. Приготовленный раствор лакказы использовался не более 3 дней. Буферные растворы и раствор фермента хранили в холодильнике ($+4^\circ\text{C}$), что обеспечивало их стабильность в течение времени исследования.

Для остановки реакции при отборе проб использовали сильное разбавление их цитратным буфером с рН 4.6 или фосфатным буфером с рН 7.4. Определение концентраций субстратов и продуктов окисления проводили спектрофотометрическим методом.

2.2 Спектрофотометрический метод анализа [11]

В основе метода молекулярной абсорбционной спектроскопии лежит поглощение электромагнитного излучения (в случае спектрофотометрии – видимого и УФ света) веществами и измерение этого поглощения по отношению к интенсивности входящего и выходящего света. Для минимизации погрешности сравнивают поглощение света исследуемым раствором и холостой пробой.

Количественные расчеты спектрофотометрического метода основаны на законе Бугера-Ламберта-Бера:

$$D = \varepsilon l C, \quad (2.1)$$

где $D = \lg(I/I_0)$ – оптическая плотность раствора, l – толщина поглощающего слоя, см, C – концентрация раствора, М, ε – молярный коэффициент экстинкции, характеризующий чувствительность измерения, $(\text{см} \cdot \text{М})^{-1}$.

Существуют различные приборы, действие которых основано на измерении поглощения электромагнитного излучения, блок-схема спектрофотометра приведена на рисунке 2.1:

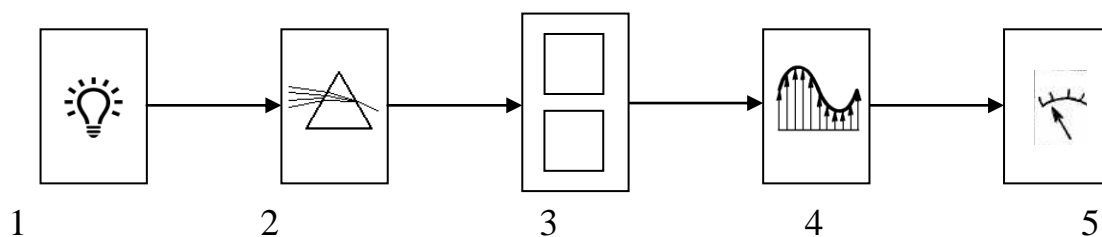


Рисунок 2.1 – Блок-схема спектрофотометра.

1 – источник излучения; 2 – монохроматор (дифракционная решетка); 3 - кюветы; 4 – преобразователь сигнала; 5 – индикатор.

В работе использовался спектрофотометр SPECORD S300 UV VIS (Германия). Для регистрации сигнала и первичной обработки полученных данных использовали программу WinAspect.

Пересчет оптической плотности в единицы концентрации проводился с использованием коэффициентов экстинкции, вычисленных из градуировочных зависимостей (рисунок 2.2). Определение концентрации проводили в цитратном (для всех исследованных субстратов) и фосфатном (большие концентрации ABTS и гидрохинона) буферных растворах.

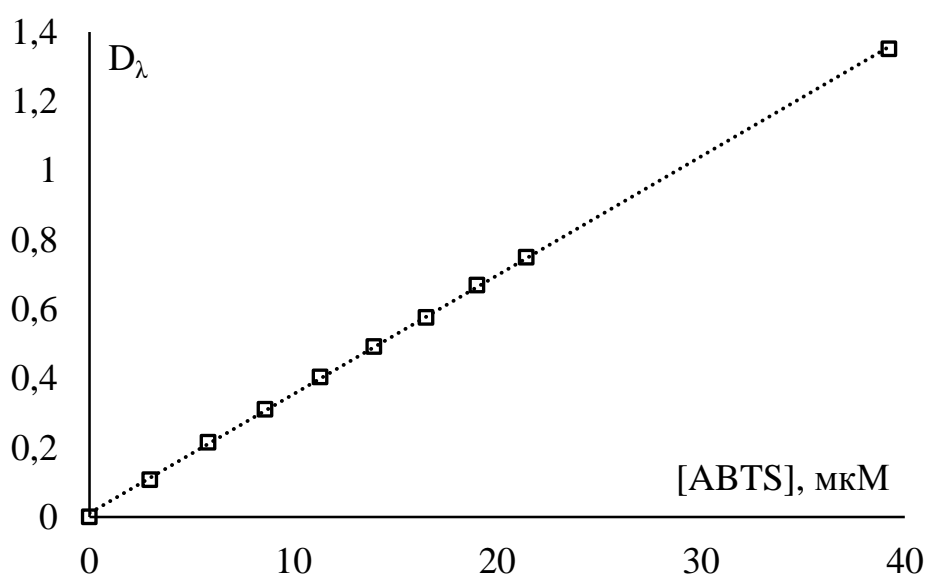


Рисунок 2.2 - Градуировочный график для ABTS. $\lambda_{max} = 341,5$ нм, цитратный буфер pH 4,6, 308 К, раствор сравнения – буфер.

РАЗДЕЛ 3

КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЛАККАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ (ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ)

Кинетику реакции окисления субстратов лакказы *Trametes versicolor* (аскорбиновая кислота, ABTS, гидрохинон) исследовали спектрофотометрически. Спектры поглощения всех этих веществ имеют выраженные полосы поглощения в УФ-области и по ним следили за убылью субстрата. Кроме того, в условиях эксперимента хорошо разделяются полосы поглощения, соответствующие продуктам окисления ABTS и гидрохинона – ABTS^{•+}-радикал и *para*-бензохинон соответственно. Продукт окисления аскорбиновой кислоты (дегидроаскорбиновая кислота) имеет очень низкий коэффициент экстинкции и в пределах используемых концентраций реагента спектрофотометрически не фиксировался. Пересчет оптической плотности в значения концентраций субстратов в реакционной смеси проводили с использованием коэффициентов молярного поглощения (экстинкции), вычисленных из градуировочных прямых (см. Экспериментальную часть).

Для исследованных субстратов провели серию опытов при небольших начальных концентрациях. Из начальных линейных участков кинетических кривых расходования субстратов получили скорости реакции (рисунок 3.1), равные их тангенсу угла наклона. Построив зависимость начальной скорости от концентрации в двойных обратных координатах (рисунок 3.2), вычислили V_{max} , K_m и затем рассчитали k_{cat} (таблица 3.1).

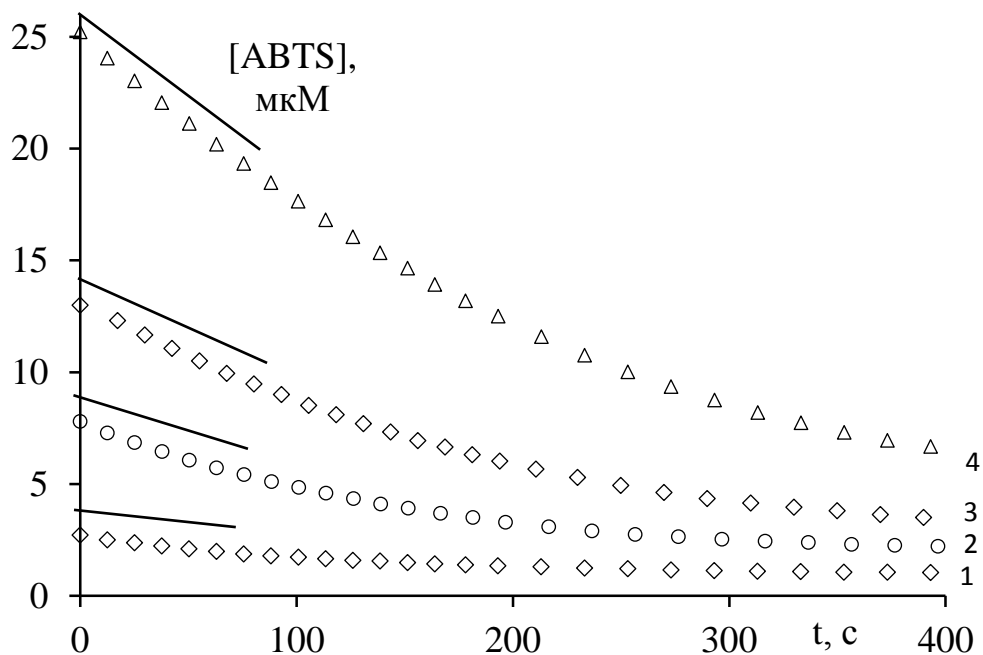


Рисунок 3.1 – Кинетические кривые расходования ABTS при его окислении молекулярным кислородом в присутствии лакказы *Trametes versicolor*. Цитратный буфер, pH 4,6; 308 К; $[E]_0 = 1.0$ мг/л, $[ABTS]_0$: 1. - 2.7 мкМ; 2. – 8 мкМ; 4. – 13 мкМ; 5. - 25 мкМ.

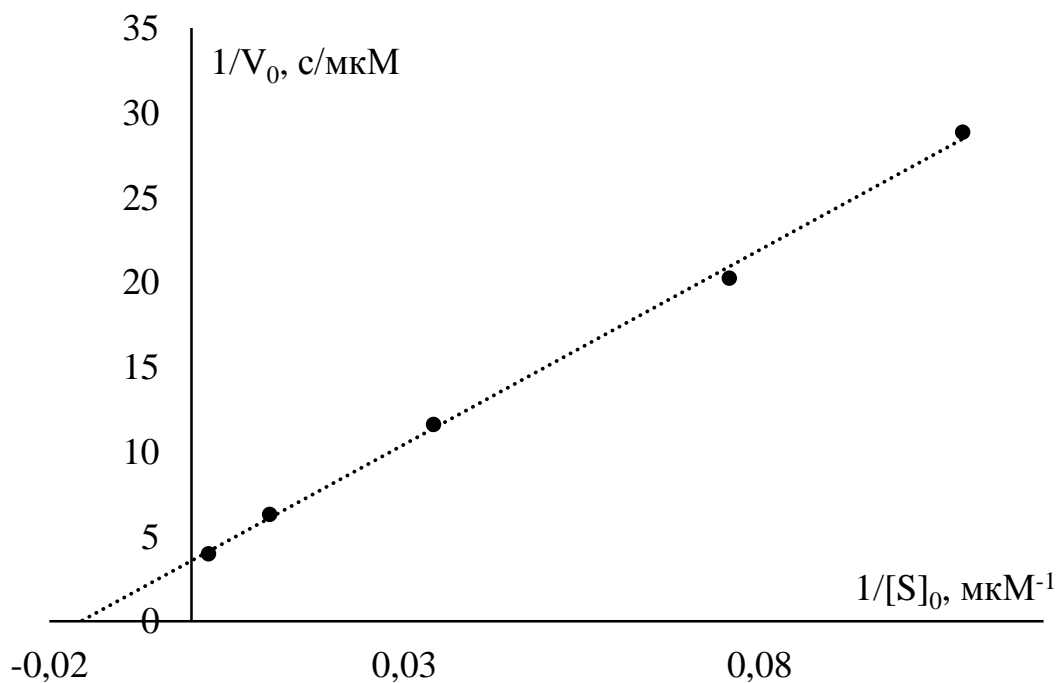


Рисунок 3.2 – Зависимость начальной скорости реакции лакказного окисления ABTS от его концентрации в координатах Лайнуивера-Берка.

Цитратный буфер, pH 4,6; 308 К; $[E]_0 = 1.0$ мг/л.

Таблица 3.1 – Кинетические параметры ферментативного окисления субстратов лакказы *Trametes versicolor*

Название субстрата	условия реакции	K_m , мМ	V_{max} , мкМ·с ⁻¹	k_{cat} , с ⁻¹
ABTS	Цитратный буфер, рН 4,6; 308 К; [E] ₀ = 1.0 мг/л,	0.05	0.22	30
гидрохинон	Цитратный буфер, рН 4,6; 308 К; [E] ₀ = 20 мг/л,	0.18	2.41	8.1
аскорбиновая кислота	Цитратный буфер, рН 4,6; 308 К; [E] ₀ = 20 мг/л,	0.3	0.79	2.7

Значения k_{cat} позволяют сравнивать реакционную способность субстратов при предположении, что кинетика их ферментативного окисления описывается моделью Михаэлиса-Ментен. В этом случае согласно данным таблицы 3.1, наиболее реакционноспособным субстратом лакказного окисления является ABTS, гидрохинон, относящийся к классическим субстратам лакказы – двухатомным фенолам – имеет среднее значение каталитической константы, и для аскорбиновой кислоты эффективность ферментативного окисления оказывается наименьшей среди исследованных субстратов.

При малых концентрациях субстратов измерение оптической плотности во времени производили в автоматическом режиме, проводя реакцию в кварцевой кювете, установленной в спектрофотометре, при ее термостатировании. Перемешиванием реакционной смеси обеспечивали протекание процесса в кинетической области. Но при больших концентрациях, когда оптическая плотность раствора не позволяет определять ее непосредственно, применили другой подход.

Реакцию проводили в стеклянном реакторе, помещенном в термостат. Перемешивание и подачу кислорода обеспечивали барботацией воздухом реакционной смеси (рисунок 3.3).

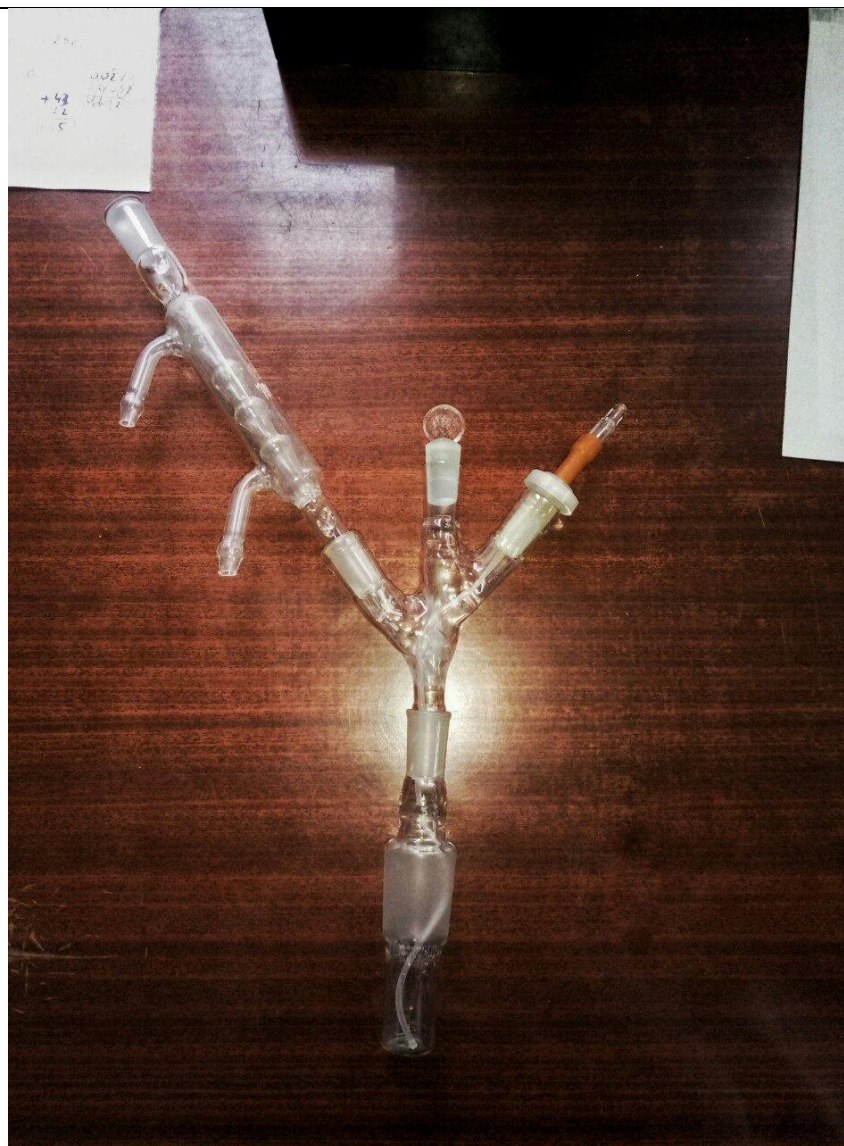


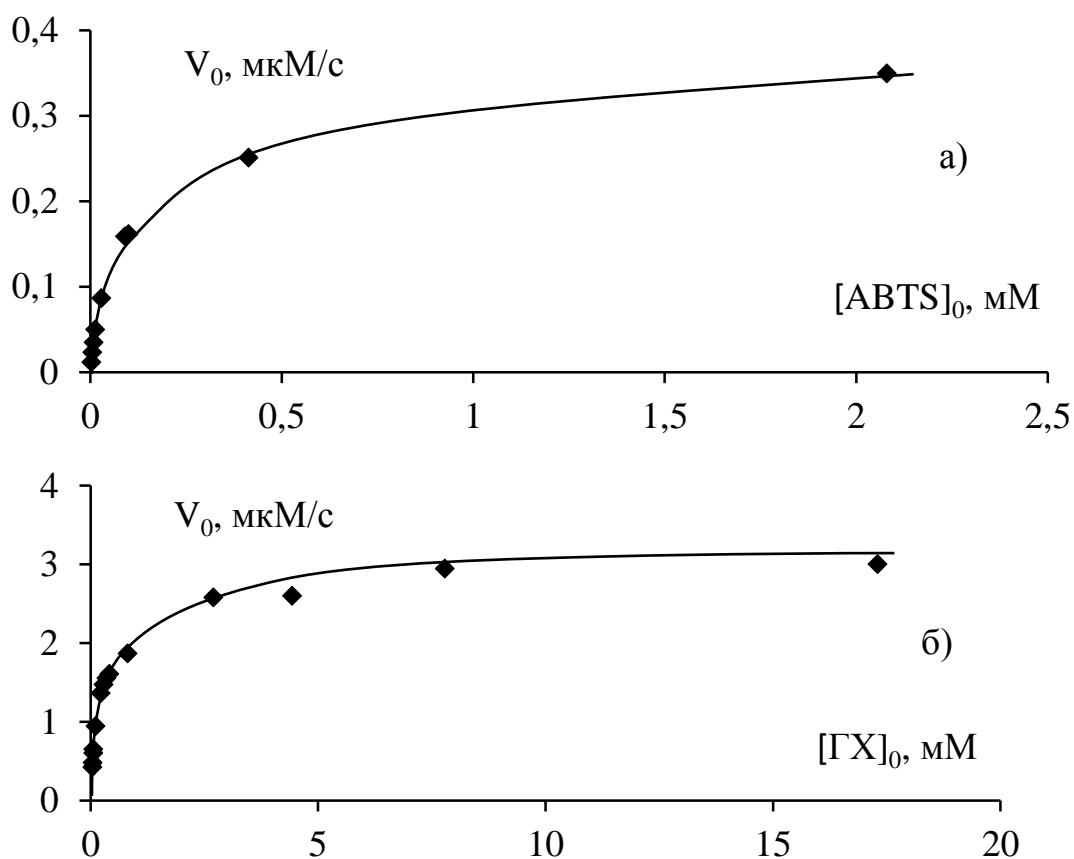
Рисунок 3.3 – Установка для проведения реакции с контролем кинетики методом отбора проб:

1. – реакционный сосуд; 2. – трехрогий форштосс; 3. – воздушный холодильник; 4. – пробка с трубкой для барботации; 5. – пробка; 6. – термостат; 8. – барботер.

Кинетику исследовали методом отбора проб, измеряя оптическую плотность разбавленной реакционной смеси. Кратность разбавления подбирали таким образом, чтобы значения оптической плотности полученных растворов находились в пределах рабочего диапазона спектрофотометра. Время отбора проб фиксировали секундомером. Отобранный объем немедленно переносили в пробирки с фосфатным буферным раствором (рН 7.4). Это обеспечивало многократное уменьшение скорости реакции за счет

разбавления, уменьшения температуры до комнатной, изменения pH до значений 7.0-7.4, при которых фермент неактивен.

В результате проведенных исследований были получены зависимости скорости окисления гидрохинона, ABTS и аскорбиновой кислоты от начальной концентрации этих субстратов в широком диапазоне концентраций (наибольшая концентрация отличается от наименьшей в 500-700 раз) при постоянной концентрации фермента. Для гидрохинона и ABTS форма этих кривых соответствует кривым с насыщением, однако для аскорбиновой кислоты запределивания не происходит (см. рис. 3.4).



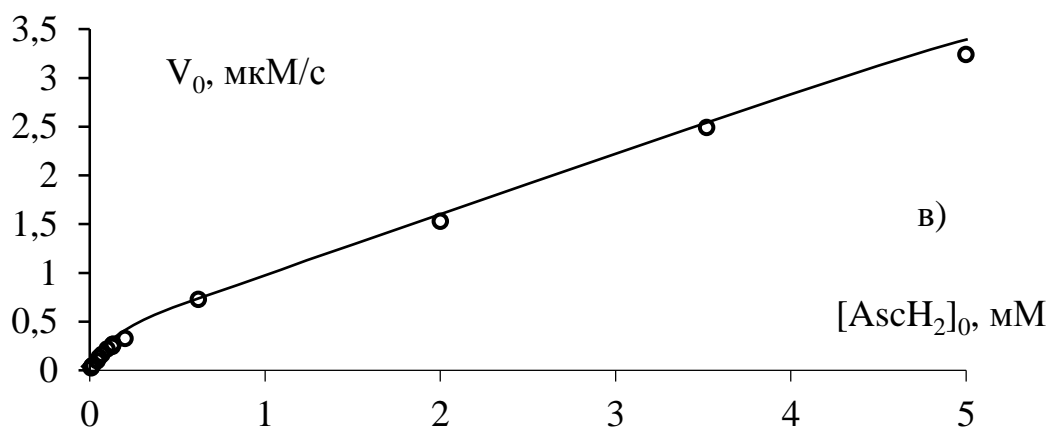
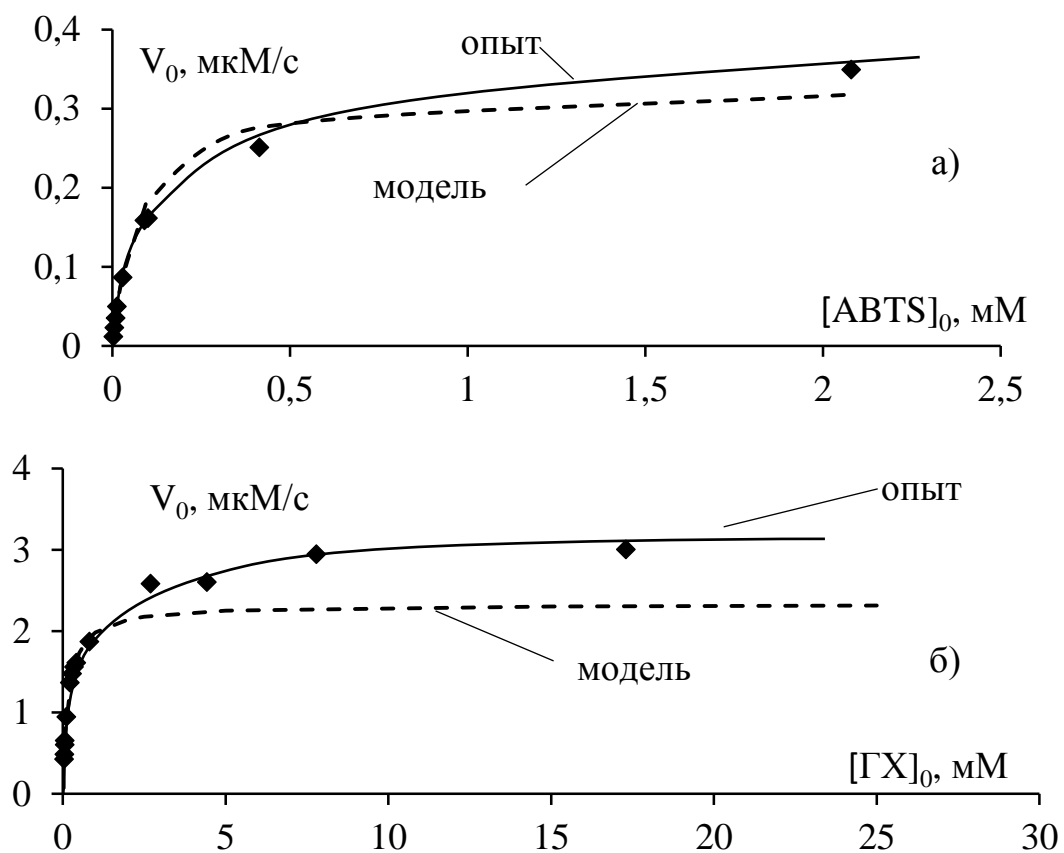


Рисунок 3.4. – Зависимость начальной скорости лакказного окисления от начальной концентрации субстратов: а) – АВТS; 2) - гидрохинон; 3) – аскорбиновая кислота.

С использованием установленных ранее значений V_{max} и K_m построили модельные кривые в координатах уравнения Михаэлиса-Ментен.



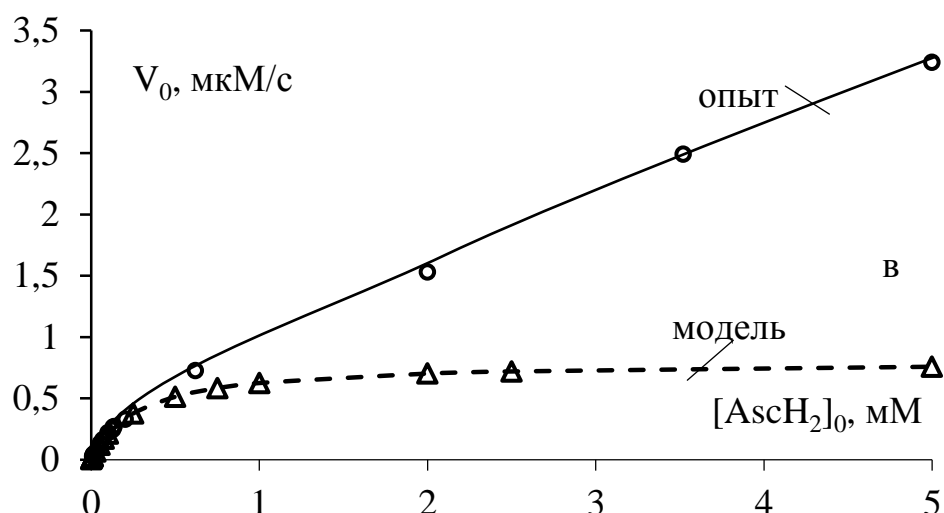


Рисунок 3.5 – Модельные и экспериментальные кривые зависимости начальной скорости лакказного окисления от начальной концентрации субстратов: а) АВТС; б) гидрохинон (ГХ); в) аскорбиновая кислота ($AscH_2$).

При сопоставлении модельных кривых с экспериментально полученными (рисунок 3.5) можно прийти к следующим заключениям:

- Наблюдается хорошее совпадение данных кривых при ферментативном окислении АВТС, окисление которого происходит по одноэлектронному механизму;
- В случае гидрохинона экспериментальная кривая практически выходит на насыщение, но его уровень выше, чем предсказывает кривая, полученная из модели Михаэлиса-Ментен;
- В случае аскорбиновой кислоты, в области небольших концентраций зависимость начальной скорости от концентрации субстрата спрямляется в координатах Лайнуивера-Берка, удастся вычислить параметры V_{max} и K_m , однако при дальнейшем увеличении концентрации насыщения не происходит, что не характерно для ферментативных процессов, скорость которых лимитирована оборотностью фермента.

ВЫВОДЫ

1. В работе сравнивалась реакционная способность трех субстратов лакказы *Trametes versicolor* на основании полученных физико-химических параметров ферментативной кинетики. Исследованные соединения можно расположить в ряд по убыванию каталитической константы (а значит, и реакционной способности в реакции лакказного окисления): ABTS, гидрохинон, аскорбиновая кислота.

2. Установлено, что в рамках уравнения Михаэлиса-Ментен с высокой точностью описывается ферментативный процесс одноэлектронного окисления ABTS.

3. Процесс двухэлектронного ферментативного окисления гидрохинона неплохо описывается в рамках классической модели ферментативной кинетики только в определенном концентрационном интервале субстрата.

4. Уравнение Михаэлиса-Ментен не может адекватно описать процесс лакказного окисления аскорбиновой кислоты.

Таким образом, сравнивать с высокой точностью реакционную способность субстратов лакказы *Trametes versicolor*, с использованием параметров ферментативной кинетики (V_{max} , K_m , k_{cat}), полученных из классической модели Михаэлиса-Ментен, можно только для субстратов, окисляющихся по одноэлектронному механизму.

Список литературы

1. Ю. А. Овчинников «Биоорганическая химия», 1987
2. Ленинджер А. Л. «Основы биохимии. Том1» , пер. С англ. – М.:Мир, 1985
3. Диксон М. «Ферменты. Том 1» пер. С англ. – М.:Мир, 1982
4. Лелевич В. В. «Биологическая химия», ГрГМУ, 2009
5. Байрамов В. М. «Основы химической кинетики и катализа», 2003
6. Кольман Я. «Наглядная биохимия», М. :2000
7. Коваленко Н. А. «Аналитическая химия», - Мн. : БГТУ, 2009
8. Turner «Органическая химия» , 1970
9. Морозова О. Н. «Химия редких элементов», Москва, 1938
10. Куликова Д. И. «Химия элементов», Казан. Гос. Технол. Ун-т. – Казань : КГТУ, 2011
11. Алемасова А. С. «Аналитическая химия», ДонНУ, 2010
12. Досон Р. «Справочник биохимика», 1991
13. Ю. А. Владимиров «Физико-химические основы фотобиологических процессов», 1989
14. Thurston, J.H. Towards a molecular model for bismuth(III) subsalicylate. Synthesis and solid-state structure of $[\text{Bi}(\text{Hsal})_3(\text{bipy})(\text{C}_7\text{H}_8)]_2$ and $[\text{Bi}(\text{Hsal})(\text{sal})(1,10\text{-phenanthroline})(\text{C}_7\text{H}_8)]_2$ / J.H. Thurston, E.M. Marlier, K.H. Whitmire // J. Chem. Soc. Chem. Comm. – 2002. – No. 23. – P. 2834–2835. DOI: 10.1039/b209188g.
15. Рогинский В.А. Фенольные антиоксиданты: реакционная способность и эффективность / В.А.Рогинский // М.: Изд-во Наука. - 1988. -274 с. 72.
16. Автоокисление фенольных антиоксидантов в водных средах: монография. / А.Н. Шендрик, И.Д. Одарюк, Л.В. Каниболоцкая и др. – Донецк: ДонНУ, 2013. –. 147 с.