

УДК 541.128.34

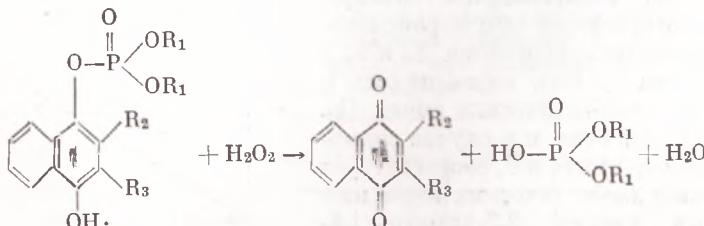
ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Г. Б. СЕРГЕЕВ, В. А. БАТЮК, С. А. БИТКО

**АКТИВАЦИЯ СУБСТРАТОМ КАТАЛИЗИРУЕМОГО
ПЕРОКСИДАЗОЙ ПРОЦЕССА ОКИСЛЕНИЯ ХИНОЛФОСФАТОВ**

(Представлено академиком Н. Н. Семеновым 28 I 1974)

При изучении кинетики и механизма окисления хинолфосфатов перекисью водорода в присутствии фермента — пероксидазы мы обнаружили явление активации окисления одного субстрата в присутствии другого. В литературе описаны не исследованные кинетически факты влияния субстратов на окисление веществ другого химического строения в случае оксидазной функции пероксидазы (¹, ²). Активирующее действие одного субстрата на другой той же химической природы для пероксидазной функции фермента неизвестно. Мы установили, что при совместном окислении двух субстратов одной химической природы в первую очередь расходуется трудно окисляемое соединение, причем скорость его превращения растет с увеличением концентрации легко окисляемого соединения. В настоящей работе указанное явление изучено на примере раздельного и совместного окисления 2,3-диметил-1,4-нафтохинол-1-диметилфосфата (S_1) и 2,3-дихлор-1,4-нафтохинол-1-диметилфосфата (S_2). Исследование кинетики реакции позволило предложить механизм катализируемого пероксидазой окисления хинолфосфатов, объясняющий активацию окисления этих субстратов на стадии взаимодействия радикалов. Показано, что при сопряженном окислении можно раздельно определять кинетические характеристики двух субстратов. Окисление нафтохинолфосфатов перекисью водорода в присутствии пероксидазы описывается уравнением:



$R_1=H, CH_3$; $R_2, R_3=H, CH_3, Cl$.

В присутствии пероксидазы, как и при некатализируемом окислении (³), основными продуктами реакции являются хиноны. Следует подчеркнуть, что в случае окисления выбранных нами субстратов хиноны — единственны поглощающие продукты реакции, образующиеся со стехиометрическим выходом. Это существенно упростило анализ кинетических данных.

В работе использовали пероксидазу из хрена ($\Delta d_{403}/\Delta d_{275}=0,3$) фирмы «Reanal» (ПХ), перекись водорода (~97%) без стабилизаторов, перегнанный метиловый спирт и бидистиллят. Синтез хинолфосфатов описан в работе (⁴). Окисление проводили в водно-метанольных растворах в присутствии буферных смесей (0,01 M ацетатный, фосфатный буферы). Инструментальные величины pH определяли с помощью pH-метра, настроенного по водным стандартным буферным растворам. Концентрацию хинолфосфатов, пероксидазы и перекиси водорода определяли спектрофотометрически.

За кинетикой реакции следили по изменению оптической плотности в максимуме поглощения 2,3-диметил-1,4-нафтохинона (270 нм) и 2,3-дихлор-1,4-нафтохинона (280 нм).

Нами установлено, что индивидуальное окисление нафтохинолфосфатов хорошо описывается принятой в литературе^(5, 6) схемой действия пероксидазы. В соответствии с этой схемой лимитирующей стадией является взаимодействие промежуточной формы пероксидазы, так называемого комплекса.

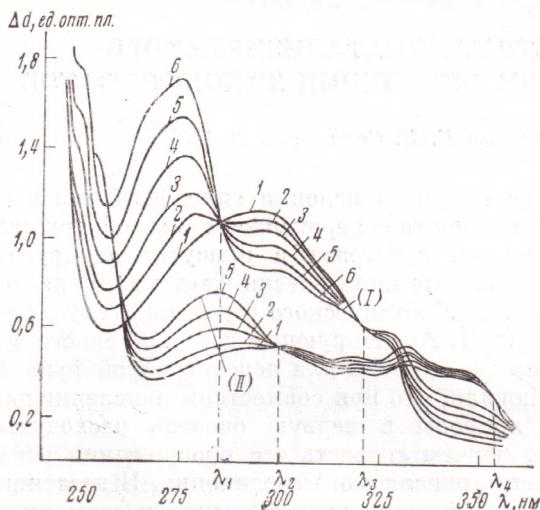


Рис. 1. Изменение спектра реакционной смеси от времени при совместном окислении S_1 и S_2 перекисью водорода, катализируемой пероксидазой (I). 25°C , 21 об. % CH_3OH , $\text{pH} 7,2$; $\mu=0,12$; $[S_1]_0=1,5 \cdot 10^{-4}$ мол/л; $[S_2]_0=0,62 \cdot 10^{-4}$; $[\text{H}_2\text{O}_2]_0=1,5 \cdot 10^{-4}$; $[\text{ПХ}]_0=0,36 \cdot 10^{-7}$ мол/л. 1-0,5 мин; 2-1,5; 3-3,5; 4-5,5; 5-8 мин. Изменение спектра реакционной смеси при окислении S_2 перекисью водорода, катализируемой пероксидазой (II). Условия те же. $[S_2]_0=0,93 \cdot 10^{-4}$ мол/л; $[\text{H}_2\text{O}_2]_0=1,5 \cdot 10^{-4}$; $[\text{ПХ}]_0=0,7 \cdot 10^{-8}$ мол/л; 1-0,5 мин; 2-1; 3-1,5; 4-2; 5-3 мин.

са E_2 , с субстратом. Соответствующие значения констант скоростей окисления S_1 и S_2 — k_{31} и k_{32} приведены в табл. 1, из данных которой видно, что в интервале $\text{pH} 4-8$ константа скорости окисления S_2 выше константы скорости окисления S_1 . Однако при совместном окислении S_1 и S_2 продуктом реакции является 2,3-диметил-1,4-нафтохинон (P_1) — продукт превращения S_1 .

На рис. 1 приведены спектры реакционных смесей при пероксидазном окислении соединения S_2 и S_1 в присутствии S_2 . Как видно из рис. 1, положение изобesticических точек (λ_1 , λ_2 , λ_3 , λ_4) различно, и в случае совместного окисления S_1 и S_2 соответствует положению изобesticических точек изомолярных смесей 2,3-диметил-1,4-нафтохинол-1-диметилфосфата и 2,3-диметил-1,4-нафтохинона.

Соединение S_2 начинает окисляться только после окисления 2,3-диметил-1,4-нафтохинол-1-диметилфосфата ($[S_1]_0=1,5 \cdot 10^{-4}$ мол/л) до глубины превращения $\sim 50\%$ при концентрации $[S_2]_0=0,62 \cdot 10^{-4}$ мол/л. Глубина превращения S_1 , при которой становится заметным окисление S_2 , существенно зависит от соотношения концентраций S_1 и S_2 в смеси. Установлено, что скорость окисления S_1 увеличивается в присутствии S_2 и растет пропорционально его концентрации. На рис. 2 показана зависимость начальной скорости окисления S_1 от концентрации соединения S_2 . Хорошо видно, что присутствие соединения S_2 оказывает сильное активирующее действие

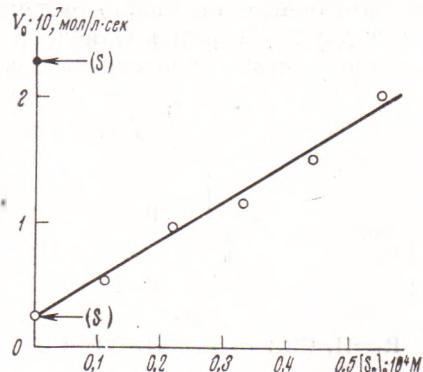
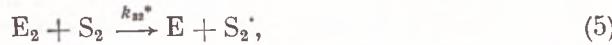
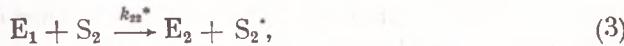


Рис. 2. Влияние S_2 на скорость пероксидазного окисления S_1 . 25°C ; 21 об. % CH_3OH ; $\mu=0,12$; $[\text{H}_2\text{O}_2]_0=1,5 \cdot 10^{-4}$ мол/л; $[\text{ПХ}]_0=0,7 \cdot 10^{-7}$; $[S_1]_0=0,74 \cdot 10^{-4}$ мол/л. Стрелками указаны значения скоростей окисления при индивидуальном окислении субстратов в одинаковых условиях

на окисление соединения S_1 . Подобное явление наблюдали и в случае хинолфосфатов другой структуры.

Для объяснения активирующего действия соединения S_2 на окисление S_1 мы предположили, что их совместное окисление происходит согласно следующей схеме:



а явление активации — результат сопряжения окисления субстратов, различающихся по своей реакционной способности, на стадиях образования и взаимодействия радикалов.

Согласно этой схеме, в стационарных условиях уравнение для начальной скорости реакции окисления S_1 имеет вид

$$V_0 = 2E_0(k_{31}^*[S_1]_0 + k_{32}^*[S_2]_0), \quad (10)$$

если учесть, что $k_2 \gg k_3$, и предположить, что для хинолфосфатов $k_1 \gg k_2$ (это соотношение выполняется для целого ряда соединений ⁽⁷⁾). Эксперимен-

таблица 1

Значения констант скоростей окисления (л/мол·сек) 2,3-диметил-1,4-нафтохинол-1-диметилфосфата (S_1) и 2,3-дихлор-1,4-нафтохинол-1-диметилфосфата (S_2) при индивидуальном окислении (k_{31} , k_{32}) и при совместном окислении (k_{31}^* , k_{32}^*) при различных рН,
CH₃OH 21 об. %, $\mu = 0,12$; 30° C

	pH 3,5	pH 4,4	pH 5,4	pH 6,3	pH 7,7	pH 8,4	pH 8,9
$k_{31} \cdot 10^{-4}$	—	1,2	0,8	0,5	—	1,0	2,5
$k_{31}^* \cdot 10^{-4}$	—	0,8	0,6	0,3	—	0,7	1,0
$k_{32} \cdot 10^{-4}$	4,5	5,5	6,4	5,6	1,7	0,4	0,8
$k_{32}^* \cdot 10^{-4}$	4,8	5,4	5,9	6,2	2,2	1,9	1,0

тальные данные по окислению соединения S_1 в присутствии S_2 описывают уравнением (10), что говорит в пользу предложенной схемы. Дополнительной проверкой предлагаемой схемы может служить определение и сопоставление констант скоростей, найденных при совместном и раздельном окислении. В случае справедливости предлагаемой схемы

$$d(V_0)/d([S_2]_0) = 2E_0 k_{32}^*. \quad (11)$$

В табл. 1 приведены значения констант скоростей окисления k_{31}^* и k_{32}^* соединений S_1 и S_2 , найденные по уравнениям (10), (11) при совместном окислении S_1 и S_2 . Сравнение констант скоростей, определенных из данных по индивидуальному окислению соединений S_1 и S_2 , с константами, полу-

ченными из данных по совместному окислению, показывает, что они близки. Близость значений констант скоростей окисления, найденных из независимых и разных по своему существу экспериментов, является веским доказательством справедливости схемы. Следует особо подчеркнуть, что при совместном окислении сначала происходит превращение только соединения S_1 . Кинетический анализ показывает, что скорость окисления S_1 контролируется кинетическими характеристиками соединения S_2 , не претерпевающего видимых изменений. Образно говоря, соединение S_2 как бы полностью передает свою способность к окислению соединению S_1 . Ускорение окисления соединения S_1 происходит за счет стадии (5), в которой оно само непосредственного участия не принимает, и стадий (7), (9). Это связано с тем, что соединение S_2 окисляется намного лучше, чем соединение S_1 , однако в результате сопряжения окисления S_1 и S_2 продуктом реакции является продукт окисления S_1 . На основании этого можно считать, что радикал S_2^\cdot активнее радикала S_1^\cdot , и скорость перекрестного взаимодействия радикалов S_1^\cdot и S_2^\cdot больше, чем скорость взаимодействия радикалов S_2^\cdot между собой. В результате этого практически происходит только окисление соединения S_1 , и продукта превращения соединения S_2 не образуется до значительного понижения концентрации S_1 .

Обнаруженное в настоящей работе явление активации окисления одного субстрата другим носит, по-видимому, общий характер и должно наблюдаться при совместном окислении двух субстратов разной активности. Обнаруженное явление активации субстратом может служить в качестве модели процесса регуляции ферментативного катализа, осуществляемого на уровне субстрата. Возможность направленно изменять скорость пероксидазного окисления может быть использована на практике, в частности, для увеличения эффективности превращения трудно окисляемых соединений.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
14 I 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ F. Irwin, J. Biol. Chem., v. 238, № 12, 3921 (1963). ² J. R. Fox, W. K. Purves, Plant Physiol., v. 43, 454 (1968). ³ В. А. Батюк, С. А. Битко, Г. Б. Сергеев, Кинетика и катализ, т. 14, № 4, 853 (1973). ⁴ Г. Б. Сергеев, В. А. Батюк и др., Вестн. Московск. унив., Химия, № 6, 674 (1970). ⁵ B. Chance, Arch. Biochem. and Biophys., v. 41, 416 (1952). ⁶ P. George, Biochem. J., v. 54, 267 (1953). ⁷ A. S. Brill, Comprehensive Biochem., v. 14, 459 (1966).