

Каталітичні властивості каталази *Penicillium vitale*. Пероксидазна реакція ферменту

Н. В. Латишко, Л. В. Гудкова, О. О. Гудкова

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
Вул. Леонтовича, 9, Київ, 01030, Україна

Досліджували пероксидазну активність каталази P. vitale з етанолом як субстратом. Встановлено, що пероксидазна активність даної каталази (5–13 од/мг) значно нижча, ніж каталазна. Вивчення стаціонарної кінетики пероксидазної реакції показало, що основні кінетичні параметри пероксидазної реакції — K_m 5,9 мМ і V_{max} 0,22 мМ/хв є нижчими від встановлених раніше параметрів каталазної реакції, проте число обертів $k_{cat} = 1,1 \cdot 10^3$ с⁻¹ і каталітична ефективність $k_{cat}/K_m = 1,9 \cdot 10^5$ М⁻¹ с⁻¹ свідчать, що цей фермент є досить ефективною пероксидазою. Як і в інших каталаз, константа швидкості пероксидазної реакції ферменту дорівнює $2,4 \cdot 10^7$ с⁻¹ · М⁻¹.

Вступ. В аеробних умовах генерація пероксиду водню є фізіологічно важливим процесом, пов'язаним з такими феноменами, як фагоцитоз, транспортні процеси і деякі інші. З іншого боку, пероксид водню є токсичним для живої клітини, і повинні бути надійні та ефективні механізми його детоксикації. В основу цих механізмів покладена каталітична дія ферментів каталази та пероксидаз, які знешкоджують H_2O_2 в певних окисних процесах клітини, що призводить до утворення низки важливих метаболітів [1]. Утилізується пероксид у мітохондріях, мікосоммах, пероксисоммах чи мембранах. Генерація та каталітичне розщеплення H_2O_2 в клітині є процесами цілеспрямованими і жорстко детермінованими. Каталаза здійснює каталітичне розщеплення H_2O_2 через каталазну або пероксидазну реакції.

Каталаза з мікроскопічного гриба *P. vitale* є одним з найвивченіших ферментів [2–6]. Вивчено її каталазну реакцію [7], проте не досліджено пероксидазної функції ферменту. Останнє й було метою даної роботи.

Матеріали і методи. В роботі використовували сухі препарати каталази (активність 2530 і 20000 од/мг) та глюкозооксидази *P. vitale* (145 од/мг), кристалічну алкогольдегідрогеназу з печінки коня і NADH фірми «Reanal» (Угорщина).

Всі інші використані реактиви були кваліфікації «осч» і «чда».

Вивчали кінетику денатурації ферменту різними концентраціями етанолу (12,5; 25 і 50 % (v/v)), інкубуючи препарати каталази в 0,01 М фосфатному буфері з відповідним вмістом органічного розчинника протягом 1 год. З інтервалом у 10 хв відбирали проби для визначення залишкової каталазної активності ферменту, як у роботі [7]. Константи інактивації розраховували з нахилу кінетичних кривих, виходячи з рівняння $\ln A = \ln A_0 - kt$.

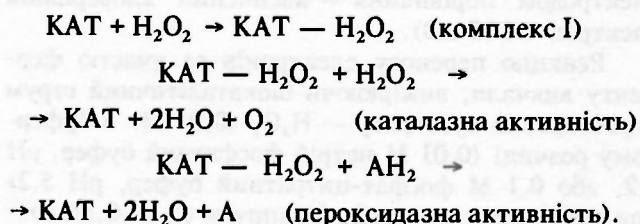
Пероксидазну активність визначали: 1) електрохімічно в комірі, що термостатується при 25 °С, за допомогою трьохелектродної системи. Як робочий використовували електрод з токопровідного матеріалу — «органічного металу» [8] (комплекс N-метилфеназін (NMФ⁺) чи N-метилакридинія (NMA⁺) і аніон-радикала 7,7,8,8-тетраціано-*n*-хінодиметана (ТЦХМ⁻) складу NMФ⁺ ТЦХМ⁻ та NMA⁺(ТЦХМ⁻)₂⁻), допоміжним електродом слугував платиновий електрод з площею поверхні 55 мм², електродом порівняння — насичений хлорсрібний електрод (+205 мВ).

Реакцію переносу електронів за участю ферменту вивчали, вимірюючи біокаталітичний струм перетворення субстрату — H_2O_2 (0,01 М) в буферному розчині (0,01 М натрій фосфатний буфер, рН 7,2, або 0,1 М фосфат-цитратний буфер, рН 5,2) при постійному потенціалі напруги (0,2–0,34 В);

2) спектрофотометрично з етанолом як другим субстратом. Для визначення кількості ацетальдегіду, що утворюється внаслідок пероксидазної реакції каталази з етанолом, використовували як пероксид водню низької концентрації (0,01—0,00012 М), так і пероксид-генеруючу систему, яка забезпечує необхідний для пероксидазної реакції постійний низький рівень пероксиду водню. Як первинну окислювальну систему ми використовували фермент глюкозооксидазу (КФ 1.1.3.4) і глюкозу. Реакційна суміш містила необхідні кількості ферменту глюкозооксидази, 1 %-го розчину глюкози, розчину каталази і 2,2 М етанол в 0,1 М ацетатному буфері, рН 5,8 — реакційна суміш 1. Відносні концентрації всіх компонентів варіювали для з'ясування оптимальних умов реакції. Реакцію проводили при кімнатній температурі (25 °С при постійному струшуванні для забезпечення аерації).

Альдегід визначали за допомогою зворотної реакції ферменту алкогольдегідрогенази (алкоголь NAD⁺ оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.1). Для цього застосовували спектрофотометричний метод [9]. До реакційної суміші 2, яка містила 1 М натрій-фосфатний буфер, рН 7,2, 0,03 М NADH та 0,1 % розчин алкогольдегідрогенази, додавали аліквоти реакційної суміші 1 і реєстрували окислення NADH, вимірюючи швидкість зміни абсорбції при 340 нм. Кількість ацетальдегіду 0,1 мкмоль відповідає зміні оптичної щільності на 0,21. Одиниця активності дорівнює утворенню 1 мкмоль ацетальдегіду · хв⁻¹ · мг⁻¹. Кінетичні параметри пероксидазної реакції визначали методом стаціонарної кінетики з кінетичних кривих за допомогою інтегральної форми рівняння Міхаеліса—Ментена. Отримані дані обробляли статистично.

Результати і обговорення. Фермент каталаза каталізує дві реакції, що проходять через утворення спільної проміжної сполуки — комплексу I. Цей інтермедіат утворюється внаслідок зв'язування пероксиду водню з активним центром ферменту. Реакція комплексу I з другою молекулою пероксиду водню призводить до утворення води та кисню (каталазна реакція). Коли з комплексом I реагує такий донор водню (АН₂), як, наприклад, етанол, продуктами є вода і ацетальдегід (пероксидазна реакція).



Відносні швидкості утворення продуктів залежать від концентрації пероксиду водню і донора водню.

Визначені раніше параметри каталазної реакції характеризують каталазу *P. vitale* як каталітично високоактивний фермент (питома активність становить 20000 од/мг) з числом обертів $2,91 \cdot 10^6 \text{ с}^{-1}$ і каталітичною ефективністю $1,27 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ [7].

Для вивчення пероксидазної активності каталази *P. vitale* було створено модель пероксид-генеруючої системи, яка стабільно забезпечувала необхідний для пероксидазної реакції постійно низький рівень пероксиду водню. Як другий субстрат реакції були використані: 1) електрод з «органічного металу» — поєднання біокаталітичного і електрохімічного процесів відбувається за рахунок прямого обміну електронів між активним центром ферменту і токопровідною матрицею та 2) етанол.

У першому випадку має місце поверхнева взаємодія токопровідної матриці з активним центром адсорбованого на ній ферменту, і окисно-відновні процеси мають відбуватися безпосередньо на електроді [8].

Показано, що каталаза *P. vitale* або її субодиниці, одержані внаслідок дії 10 М сечовини чи 0,2 %-го SDS для розгортання білкової глобули і збільшення досяжності електронів з поверхні електродів до простетичної групи ферменту, не каталізували електровідновлення Н₂О₂ при використанні електрода з «органічного металу» (органічні комплекси, які володіють провідністю металів при кімнатній температурі).

Результати цих дослідів узгоджуються з даними Самалюса [10], які показали, що каталаза тваринного походження з активністю 142 од/мг, іммобілізована на токопровідних матеріалах, також не каталізує електровідновлення Н₂О₂. Очевидно, це пов'язано з доступністю гемової групи для субстрату, тобто зі стеричними обмеженнями — гемові групи заглиблені в тетрамер на 20 Å від поверхні молекули [5].

Кристаллографічні дослідження активного центра каталази *P. vitale* [4, 5] показали, що гем розташований глибоко всередині білкової глобули на відстані 17 Å від найближчих ділянок поверхні, з якою він зв'язується гідрофобним тунелем. Розміри цього тунелю повинні співвідноситися з розмірами молекул субстратів. Ці стеричні обмеження, зокрема, обумовлюють каталітичні особливості даного ферменту. Виходячи з будови активного центра каталази, можна було передбачити високу каталазну ефективність ферменту, а також залежність пероксидазної функції ферменту безпосередньо від розмірів другого субстрату. Таким чи-

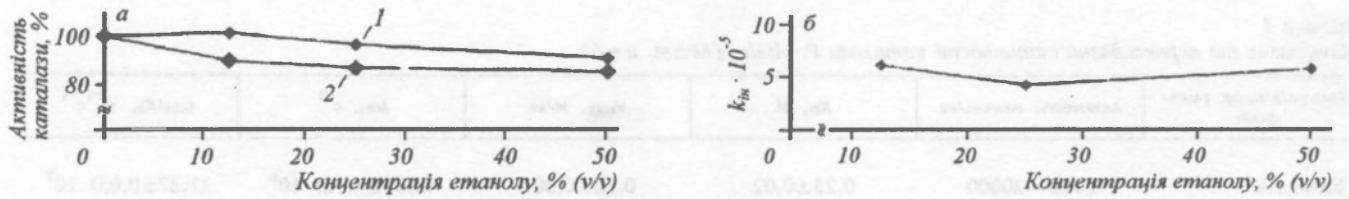


Рис. 1. Вплив етанолу на: а — активність каталази (1 — 10 хв, 2 — 60 хв); б — константу швидкості інактивації каталази

ном, у присутності субстратів малих розмірів каталаза здатна функціонувати як пероксидаза.

Другим субстратом для визначення пероксидазної активності каталази *P. vitale* був етанол. Ми зупинили свій вибір на етанолі з трьох причин. По-перше, молекула етанолу має невеликий розмір. По-друге, відомо, що разом з алкогольдегідрогеназою каталаза бере участь у детоксикації етанолу в організмі [11]. По-третє, етанол використовується для хімічної очистки каталази і, оскільки він є органічним розчинником, може викликати денатурацію молекули ферменту та зміну її каталітичної активності [12].

Виходячи з цього, досліді почали з визначення стабільності молекули каталази *P. vitale* по відношенню до етанолу. Ми вивчали стабільність цієї каталази в етанолі різної концентрації протягом 60 хв. Було встановлено, що фермент навіть після дії 50 %-го розчину етанолу протягом цього часу зберігає понад 80 % своєї активності (рис. 1, а) і константи інактивації при цьому були невеликими (порядку 10^5 с^{-1} (рис. 1, б)). Таким чином, встановлено досить високу стабільність молекули каталази відносно етанолу.

Пероксидазну активність ферменту з етанолом як донатором електронів оцінювали за кількістю утвореного в результаті реакції ацетальдегіду, який визначали за допомогою спектрофотометричного ензиматичного методу. Для цього був використаний фермент алкогольдегідрогеназа, що каталізує реакцію



Тобто для визначення альдегіду ми використовували зворотну реакцію ферменту.

Визначено, що пероксидазна активність очищеного препарату каталази з каталазною активністю 2530 од/мг становить 5—13 од/мг.

На рис. 2 представлено динаміку утворення ацетальдегіду під час реакції каталази з етанолом. З лінійної ділянки кінетичної кривої було розрахо-

вано константу швидкості реакції, що дорівнює $2,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$.

За допомогою інтегральної форми рівняння Міхаеліса—Ментена (рис. 3) було знайдено основні кінетичні параметри пероксидазної реакції ферменту, які порівнюються з визначеними раніше параметрами каталазної реакції (табл. 1).

Як видно з табл. 1, каталазна активність досліджуваного ферменту більше ніж на два порядки вища за пероксидазну. Крім того, на декілька порядків меншими є значення основних кінетичних

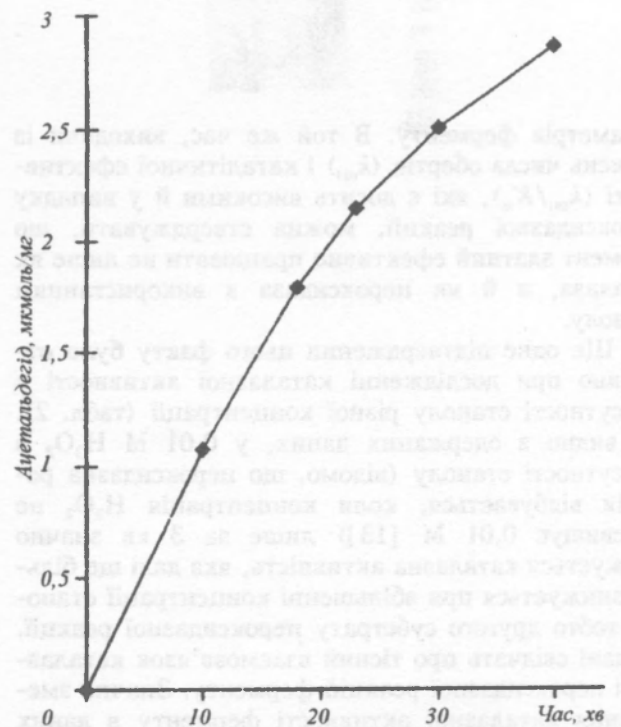


Рис. 2. Динаміка утворення ацетальдегіду

Таблиця 1
Каталазна та пероксидазна активності каталази *P. vitale* ($M \pm m$, $n = 6$)

| Реакція/донатор електронів | Активність, мкмоль/хв | K_m , М | V_{max} , М/хв | k_{cat} , s^{-1} | k_{cat}/K_m , $M^{-1} s^{-1}$ |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Каталаза* | 2500—20000 | $0,23 \pm 0,02$ | $0,58 \pm 0,001$ | $(2,91 \pm 0,12) \cdot 10^6$ | $(1,27 \pm 0,05) \cdot 10^7$ |
| Пероксидаза: органічний метал | 0 | — | — | — | — |
| Етанол** | 5—13 | $(5,89 \pm 0,24) \cdot 10^{-3}$ | $(2,20 \pm 0,11) \cdot 10^{-4}$ | $(1,10 \pm 0,06) \cdot 10^3$ | $(1,87 \pm 0,05) \cdot 10^5$ |

*Мкмоль H_2O_2 /хв; **мкмоль ацетальдегіду/хв.

Таблиця 2
Залежність каталазної активності каталази *P. vitale* від концентрації етанолу ($M \pm m$, $n = 3$)

| Концентрація етанолу, % | Каталазна активність ферменту, + | |
|-------------------------|----------------------------------|-------|
| | од. | % |
| 0 | $12864,8 \pm 408,64$ | 100 |
| 9,7 | $8149 \pm 1135,2$ | 63,43 |
| 24,3 | $4073,36 \pm 598,77$ | 31,64 |
| 48,5 | $1515,13 \pm 282,07$ | 11,79 |

параметрів ферменту. В той же час, виходячи із значень числа обертів (k_{cat}) і каталітичної ефективності (k_{cat}/K_m), які є досить високими й у випадку пероксидазної реакції, можна стверджувати, що фермент здатний ефективно працювати не лише як каталаза, а й як пероксидаза з використанням етанолу.

Ще одне підтвердження цього факту було отримано при дослідженні каталазної активності в присутності етанолу різної концентрації (табл. 2). Як видно з одержаних даних, у 0,01 М H_2O_2 в присутності етанолу (відомо, що пероксидазна реакція відбувається, коли концентрація H_2O_2 не перевищує 0,01 М [13]) лише за 3 хв значно знижується каталазна активність, яка далі ще більше знижується при збільшенні концентрації етанолу, тобто другого субстрату пероксидазної реакції. Ці дані свідчать про тісний взаємозв'язок каталазної і пероксидазної реакції ферменту. Значне зменшення каталазної активності ферменту в даних умовах свідчить про зміну співвідношення каталазної і пероксидазної активності ферменту в повній реакції розщеплення пероксиду водню.

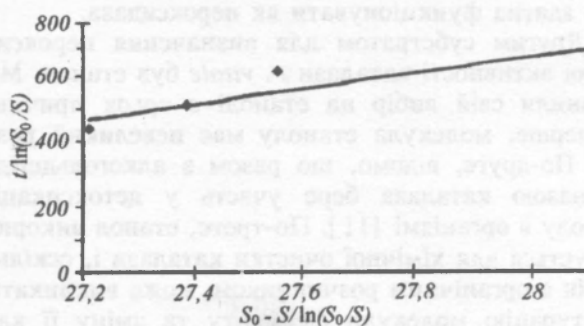


Рис. 3. Визначення кінетичних параметрів пероксидазної реакції

Таким чином, порівнюючи каталітичні параметри каталазної і пероксидазної реакцій, можна зробити висновок стосовно того, що домінують дією каталази *P. vitale* є дисоціація H_2O_2 на кисень та воду (каталазна реакція). Проте фермент може працювати і як досить ефективна пероксидаза в разі використання донаторів водню невеликих розмірів у присутності пероксид-генеруючої системи або достатньо низьких концентрацій пероксиду водню. Показано також, що пероксидазна і каталазна функції ферменту взаємопов'язані, і поява пероксидазної активності завжди супроводжується значним зниженням каталазної функції.

Н. В. Латышко, Л. В. Гудкова, О. А. Гудкова

Каталитические свойства каталазы *Penicilium vitale*.
Пероксидазная реакция фермента

Резюме

Исследовали пероксидазную активность каталазы *P. vitale* с этанолом в качестве субстрата. Установлено, что пероксидазная активность данной каталазы (5—13 ед/мг) значительно ниже каталазной. Изучение стационарной кинетики пероксидазной реакции показало, что основные кинетические пара-

метры пероксидазної реакції — K_m 5,9 мМ і V_{max} 0,22 мМ/мін нижче, чем установленные ранее параметры каталазной реакции, однако число оборотов $k_{cat} = 1,1 \cdot 10^5 \text{ с}^{-1}$ и каталитическая эффективность $k_{cat}/K_m = 1,9 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ свидетельствуют о том, что данный фермент является довольно эффективной пероксидазой. Как и у других каталаз, константа скорости пероксидазной реакции равна $2,4 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

N. V. Latyshko, L. V. Gudkova, O. A. Gudkova

Catalytic properties of the *Penicillium vitale* catalase. Peroxidatic reaction of the enzyme

Summary

Peroxidatic activity of the *P. vitale* catalase with ethanol as a substrate was investigated. It was determined that the peroxidatic activity of the catalase (5–13 U/mg) was over a hundred times less the catalatic activity. Study of the steady-state kinetics showed that kinetic parameters of peroxidatic reaction — K_m 5.9 mM and V_{max} 0.22 mM/min were lower than estimated earlier kinetics of the catalytic reaction. However, the turnover number $k_{cat} = 1.1 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ and catalatic efficiency k_{cat}/K_m ratio $1.9 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ testify the catalase is rather effective peroxidase. The enzyme has the rate constant of the peroxidatic action equal to $2.4 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ as catalases of other origins.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ramasarma T. Generation of H_2O_2 in biomembranes // Biochim. et biophys. acta.—1982.—694, N 1.—P. 69—93.
2. Гудкова Л. В., Кириленко М. Т., Левитина Т. Л. Исследование субъединичной структуры каталазы *Penicillium vitale* // Укр. биохим. журн.—1985.—57, № 4.—С. 29—33.
3. Гудкова Л. В., Латышко Н. В., Дегтярь Р. Г., Гулый М. Ф., Янишпольский В. В., Тертых В. А. Иммунизация каталазы *Penicillium vitale* Pldopl. et Bilal на неорганических носителях // Укр. биохим. журн.—1980.—52, № 5.—С. 614—623.
4. Vainstein B. K., Melik-Adamyan W. R., Barynin V. V. Three-dimensional structure of the enzyme catalase // Nature.—1981.—292, N 1.—P. 411—412.
5. Fita I., Rossmann M. G. The active center of catalase // J. Mol. Biol.—1985.—185.—P. 21—37.
6. Kozlov E. A., Levitina T. L., Bobrovskaya M. T., Gudkova L. V., Latyshko N. V., Radomskii N. F. The complete amino acid sequence of the catalase from *Penicillium vitale* // Rus. J. Bioorg. Chem.—1988.—24, N 3.—P. 145—151.
7. Латышко Н. В., Гудкова Л. В. Кинетические и каталитические свойства каталазы *Penicillium vitale* // Укр. биохим. журн.—1996.—68, № 2.—С. 69—73.
8. Kulis J. J., Samalius A. S., Švirnickas G.-J. S. Electron exchange between the enzyme active center and organic metal // FEBS Lett.—1980.—114, N 1.—P. 7—10.
9. Racker E. Spectrofotometric enzymatic methods for the determination aldehydes and ketoaldehydes // Meth. Enzymol.—1957.—3.—P. 293—296.
10. Самалюс А. С. Функционирование иммобилизованных на токопроводящих материалах гемсодержащих ферментов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.—Вильнюс, 1984.—19 с.
11. Oshino N., Oshino R., Chance B. The characteristic of the «peroxidatic» reaction of catalase in ethanol oxidation // Biochem. J.—1973.—131, N 3.—P. 555—567.
12. Клибанов А. М., Семенов А. Н., Самохин Г. П., Мартинек К. Ферментативные реакции в водно-органических смесях: критерий для выбора оптимального органического растворителя // Биоорг. химия.—1978.—4, № 1.—С. 82—88.
13. Aebi H. Catalase // Methods of Enzymatic Analysis.—New York: Acad. press, 1974.—Vol. 2.—P. 673—685.

УДК 577.152.111:577.322.54
Надійшла до редакції 10.04.2000