



УДК 577.152.1

МЕХАНИЗМ СОВМЕСТНОГО ОКИСЛЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ГИДРОХИНОНА В ПРИСУТСТВИИ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

© 1999 г. В. В. Рогожин[#], В. В. Верхотуров*Якутская государственная сельскохозяйственная академия,
677002, Якутск, ул. Красильникова, 15*

Поступила в редакцию 30.07.98 г. Принята к печати 28.12.98 г.

Изучена стационарная кинетика совместного пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты и гидрохинона, катализируемого пероксидазой хрена. Показано, что аскорбиновая кислота и гидрохинон окисляются последовательно; гидрохинон активирует окисление аскорбиновой кислоты. Избыток аскорбиновой кислоты ингибирует пероксидазу в реакции совместного окисления субстратов при pH 5–7. Определены величины каталитических констант (k_{cat} , K_m , K_a). Предложен возможный механизм активации пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты в присутствии гидрохинона и рассмотрено его биологическое значение.

Ключевые слова: пероксидаза хрена; аскорбиновая кислота; гидрохинон.

Аскорбиновая кислота и гидрохинон в растительных и животных клетках могут вступать в окислительно-восстановительные реакции [1], выполнять роль антиоксидантов [2, 3]. Функции и свойства гидрохинона в различных метаболических процессах в растениях до конца не изучены. Известно, что, попеременно окисляясь и восстанавливаясь, фенольные соединения служат связывающим звеном между водородом “дыхательного” субстрата и кислородом окружающей среды [4]. С использованием изотопной метки было показано, что основным местом образования фенольных соединений являются молодые ткани растений [5]; особенно высокая скорость синтеза фенолов наблюдается в хлоропластах при освещении. В этих органеллах в процессе фотосинтеза с высокой скоростью образуются полифенолы сравнительно простой структуры, которые затем транспортируются в другие компартменты клетки [4]. Биологическое действие фенольных соединений в клетке обусловлено наличием гидроксильных групп, которые способны к ступенчатой отдаче электронов [6]. В инфицированных растениях активированный кислород может быть посредником в противомикробном действии растительных фенолов, которые способны ингибировать цепные реакции метаболизма, запускаемые свободными радикалами [7]. Например, антисептическое действие арбутина можно объяснить присутствием структуры гидрохинона в

составе молекулы арбутина [8] (однако функциональная роль арбутина до конца не изучена, мало данных и по механизму действия гидрохинона в растениях, особенно в семенах). Аскорбиновая кислота может накапливаться в различных растительных клетках и тканях, а также в хлоропластах [9], в митохондриях [10], в околоядерной зоне и во внешнем слое цитоплазмы растительной клетки [11]; в клетках корня хрена вся аскорбиновая кислота сосредоточена в больших центральных вакуолях [12]. Окисление аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую кислоту кроме специализированной аскорбатоксидазы [13] могут катализировать и другие оксидазы растительных и животных тканей: цитохромоксидаза, фенолоксидаза, пероксидаза [14]. Из этих ферментов в растительных тканях больше всего представлена пероксидаза, которая, обладая широкой субстратной специфичностью, катализирует реакцию окисления неорганических и органических соединений перекисью водорода [15], тем не менее механизм действия фермента недостаточно изучен [4]. Известно, что общим свойством пероксидазных систем являются эффекты субстрат-субстратной активации, т.е. ускорения окисления медленно окисляемого субстрата быстро окисляемым [16]. Аскорбиновую кислоту можно отнести к медленно окисляемым субстратам пероксидазы [17], вместе с тем пероксидазное окисление ее в присутствии различных субстратов мало исследовано. Поэтому в нашей работе были поставлены следующие задачи: изучить совместное пероксидазное окисление аскорбиновой кислоты и гидрохинона, катализируемое пероксидазой хрена, вы-

Сокращения: АК – аскорбиновая кислота; ГХ – гидрохинон.

[#] Автор для переписки (тел.: 25-84-79; факс: (4112) 26-49-49).

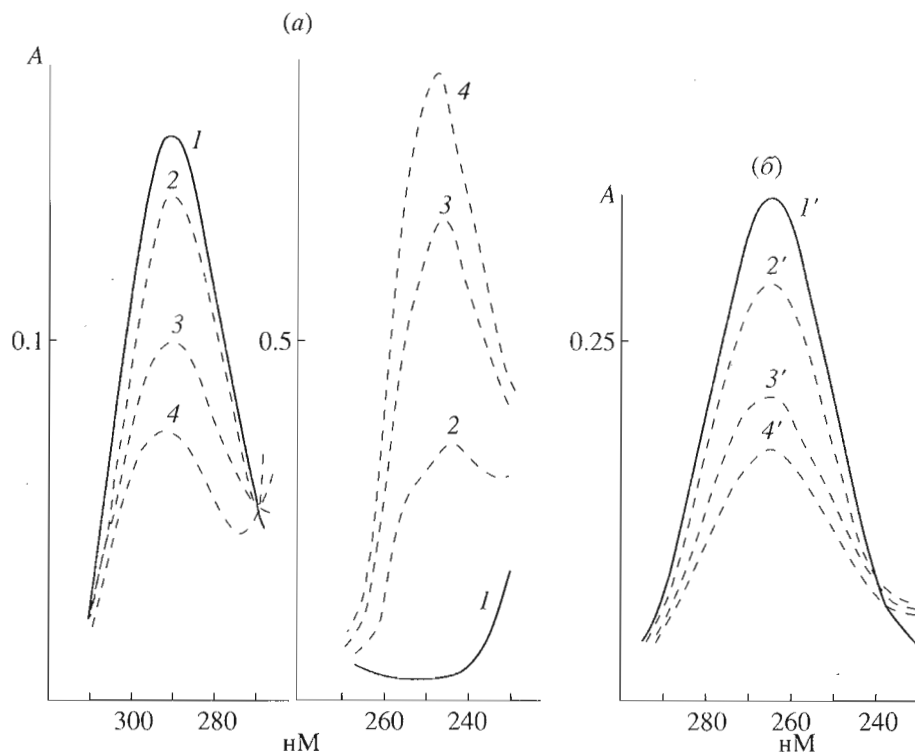


Рис. 1. Спектры поглощения гидрохинона (а) и аскорбиновой кислоты (б) и продуктов их индивидуального пероксидазного окисления в 0.1 М Na-фосфатном буфере, рН 7.0. Время реакции: 0 (1, 1'), 0.25 (2, 2'), 1.5 (3, 3') и 3 мин (4, 4'). Концентрации: АК – 50 мкМ, гидрохинон – 70 мкМ, пероксидаза – 52 нМ (а) и 104 нМ (б), перекись водорода – 0.64 мМ.

явить эффекты взаимной активации и ингибирования этих двух субстратов, определить механизм активирования и предложить объяснение возможности использования этого механизма в растительных организмах.

На рис. 1 приведены спектры поглощения гидрохинона и аскорбиновой кислоты, а также продуктов их окисления. Максимумы поглощения гидрохинона и аскорбиновой кислоты при рН 7.0

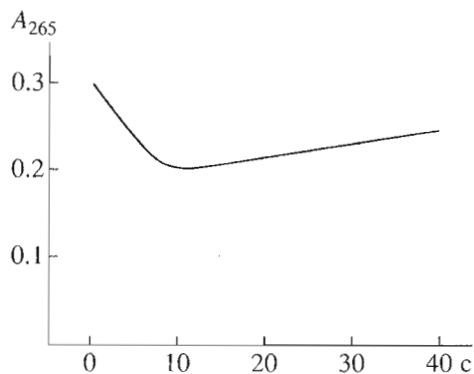


Рис. 2. Кинетическая кривая совместного окисления аскорбиновой кислоты и гидрохинона при рН 7.0. Концентрации: пероксидаза – 2.4 нМ, перекись водорода – 0.64 мМ, гидрохинон – 0.1 мМ, АК – 44 мкМ.

находятся при 290 и 265 нм, что соответствует литературным данным [18]. При индивидуальном окислении в присутствии пероксидазы в спектре гидрохинона отмечается понижение поглощения при 290 нм и появление максимума поглощения при 245 нм (рис. 1а). Пероксидазное окисление аскорбиновой кислоты сопровождается понижением поглощения при 265 нм (рис. 1б). В смеси гидрохинон и аскорбиновая кислота в присутствии перекиси водорода и пероксидазы окисляются дифференцированно (в отсутствие фермента окисления не наблюдалось): в течение первых минут проведения реакции спектр реакционной смеси изменялся – максимум поглощения аскорбиновой кислоты при 265 нм полностью исчезал и вслед за этим появлялся максимум поглощения при 245 нм, характерный для продукта окисления гидрохинона. Следует отметить, что при используемых концентрациях фермента индивидуальное окисление аскорбиновой кислоты протекает чрезвычайно медленно [17]. Следовательно, пероксидазное окисление аскорбиновой кислоты активируется гидрохиноном.

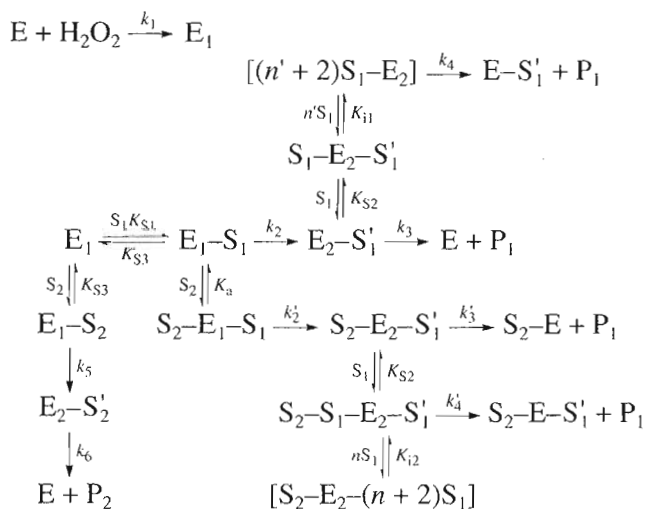
Из рис. 2 видно, что при совместном присутствии аскорбиновой кислоты и гидрохинон окисляются последовательно. Окисление гидрохинона не наблюдается до полного превращения аскорбиновой кислоты.

Кинетика пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты в присутствии гидрохинона не подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен (рис. 3). При высоких концентрациях аскорбиновая кислота ингибирует реакцию: зависимость v_0 от $\lg[AK]$ имеет вид несимметричного колокола, правая ветвь которого значительно круче левой (рис. 3). Подобная форма кривой может указывать на то, что ингибирование реакции происходит за счет присоединения нескольких молекул (n) аскорбиновой кислоты к фермент-субстратному комплексу [19]. Для расчета константы Михаэлиса и определения числа молекул аскорбиновой кислоты (n) был использован предложенный в работах [17, 19] графический способ. Экспериментальные данные были представлены в координатах $(1/[AK] + [AK]^n/K_{m(каж)}K_s', 1/v_0)$ и подбирались значения n , при которых наблюдается линеаризация (рис. 4) [19]:

$$\frac{1}{[AK]} + \frac{[AK]^n}{K_{m(каж)}K_s'} = \frac{V_m}{K_{m(каж)}v_0} - \frac{1}{K_{m(каж)}}$$

При увеличении концентрации гидрохинона скорость пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты возрастала (рис. 5). Зависимости начальных скоростей в двойных обратных координатах при pH 4–8 имели вид семейства прямых с изломами, пересекающихся на оси абсцисс. Активатор не влиял на значение $K_{m(каж)}$, не повышал k_{cat} пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты. Это соответствует неконкурентному типу активации ($\alpha = 1, \beta > 1$), при котором субстрат и активатор связываются независимо и образуют комплекс, в котором ускоряется превращение субстрата

Ниже приведена схема, которая иллюстрирует суммарный процесс ферментативного окисления:



E, E_1 и E_2 – исходный фермент и его промежуточные соединения (1) и (2), соответственно, S_1, S_2 ,

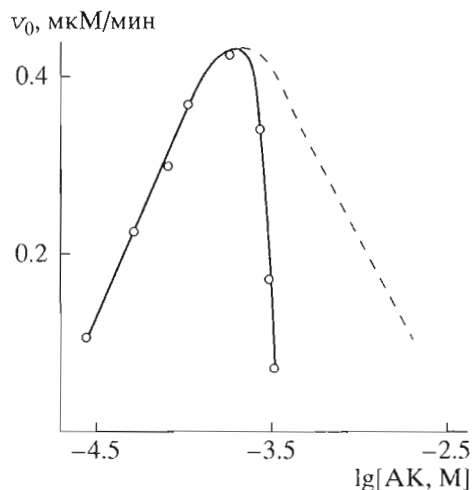


Рис. 3. Ингибирование реакции совместного пероксидазного окисления АК и гидрохинона избытком аскорбиновой кислоты. Штриховая линия является теоретической и отражает условия образования неактивного фермент-субстратного комплекса. 0.1 М Na-фосфатный буфер, pH 5.5. Концентрации: пероксидаза – 40 нМ, гидрохинон – 1 мкМ, перекись водорода – 0.64 мМ, АК – 22–310 мкМ.

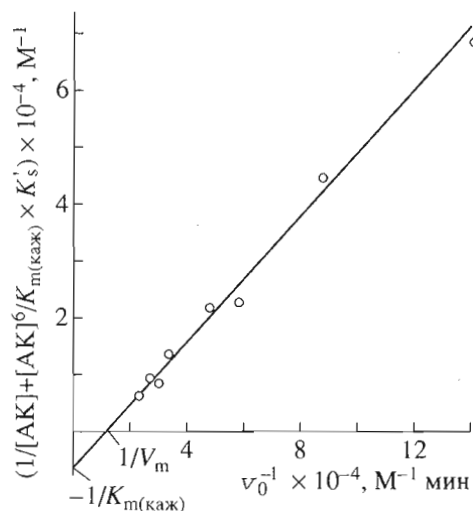


Рис. 4. Линеаризация экспериментальных данных по кинетике совместного пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты и гидрохинона (рис. 3). Условия см. в подписи к рис. 3.

P_1, P_2 – аскорбиновая кислота, гидрохинон и продукты их окисления, соответственно, $S_2 - E, E - S_1', E_1 - S_1, E_1 - S_2, E_2 - S_1', E_2 - S_2', S_1 - E_2 - S_1', S_2 - E - S_1', S_2 - E_1 - S_1, S_2 - E_2 - S_1', S_2 - S_1 - E_2 - S_1', [(n + 2)S_1 - E_2], [S_2 - E_2 - (n + 2)S_1]$ – комплексы одной, двух, трех, $(n + 2)$ и $(n + 2)$ молекул субстратов и их полуокисленных форм с нативным ферментом и промежуточными соединениями (E_1 и E_2). $K_{S1}, K_{S2}, K_{S3}, K_a$ – констан-

Величины каталитических констант для индивидуального и совместного пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты и гидрохинона

| pH | $K_m(\text{AK}),$ мкМ | k_3, c^{-1} | k_4, c^{-1} | $K_m(\text{ГХ}),$ мкМ | k_6, c^{-1} | $K_a, \text{мкМ}$ | β_1 | β_2 | n | n' |
|-----|--------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|-------------------|------------|------------|-----|------|
| 4.0 | 420 ± 30 | | 25.0 ± 2.2 | 340 ± 20 | 1220 ± 60 | 3.7 ± 0.1 | | 3.1 ± 0.1 | 5 | 8 |
| 5.0 | 340 ± 30 | 2.1 ± 0.12 | 18.0 ± 2.5 | 360 ± 25 | 2210 ± 210 | 6.7 ± 0.2 | 3.2 ± 0.2 | 9.2 ± 0.5 | 7 | 8 |
| 5.5 | 170 ± 15 | 1.9 ± 0.11 | 6.8 ± 0.3 | 340 ± 18 | 2225 ± 210 | 7.8 ± 0.2 | 7.1 ± 0.4 | 23.3 ± 1.2 | 8 | 7 |
| 6.0 | 190 ± 20 | 1.1 ± 0.11 | 8.0 ± 0.9 | 300 ± 15 | 1910 ± 150 | 10.7 ± 0.3 | 11.5 ± 0.5 | 34.8 ± 2.5 | 2 | 6 |
| 7.0 | 270 ± 25 | 1.1 ± 0.10 | 3.7 ± 0.1 | 150 ± 10 | 1740 ± 110 | 3.5 ± 0.1 | 15.1 ± 0.6 | 40.7 ± 3.0 | 2 | 9 |
| 8.0 | 170 ± 20 | | 2.9 ± 0.1 | 80 ± 5 | 1520 ± 100 | 0.19 ± 0.02 | | 3.7 ± 0.2 | 8 | 9 |

ты диссоциации соответствующих комплексов фермента с субстратами, K_{i1}, K_{i2} – константы равновесия, $k_1, k_2, k_3, k_4, k'_1, k'_2, k'_3, k'_4$ – каталитические константы ($k'_3 = \beta_1 k_3, k'_4 = \beta_2 k_4$).

Определение константы активирования (K_a) и коэффициентов β как в присутствии, так и в отсутствие гидрохинона, при различных концентрациях аскорбиновой кислоты проводили по уравнению [19]:

$$\frac{1}{k_{(\text{каж})}/k_{\text{кат}} - 1} = \frac{1}{\beta - 1} + \frac{K_a}{\beta - 1} \frac{1}{[\text{ГХ}]}$$

Значения кинетических констант для реакций индивидуального и совместного пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты и гидрохинона, катализируемого пероксидазой хрена, и число молекул аскорбиновой кислоты, переводящих

фермент в неактивное состояние при различных pH, показаны в таблице.

Индивидуальное пероксидазное окисление аскорбиновой кислоты осуществляется, если с окисленными формами пероксидазы (E_1 и E_2) связываются одна или две молекулы аскорбиновой кислоты [17]. При связывании двух молекул аскорбиновой кислоты наблюдается активирование фермента. Связывание в активном центре пероксидазы нескольких молекул субстрата (n') ингибирует фермент (таблица).

При совместном окислении аскорбиновой кислоты и гидрохинона осуществляется процесс окисления, в котором вначале преимущественно расходуется медленно окисляющийся субстрат. Очередность задается тем, что связывание аскорбиновой кислоты с окисленными формами пероксидазы почти на два порядка эффективнее, чем связывание гидрохинона (таблица). Предварительное связывание аскорбиновой кислоты в активном центре фермента улучшает в 28–420 раз последующее связывание молекул гидрохинона. Однако, связавшись, гидрохинон не оказывает влияния на связывание второй молекулы кислоты, что выражается в неконкурентном типе активирования. Присутствие гидрохинона в активном центре фермента способствует ускорению окисления молекул аскорбиновой кислоты в 4–41 раз. Особенно этот эффект проявляется при pH 5.5–7.0. Оптимум активирования приходится на pH 6–7. Высокие же концентрации аскорбиновой кислоты ингибируют фермент как в реакциях индивидуального, так и совместного с гидрохиноном пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты. Причем, если при pH 6–7 в реакциях индивидуального окисления аскорбиновой кислоты фермент ингибируется 6–9 молекулами субстрата, то в реакциях ее совместного окисления с гидрохиноном ингибирование пероксидазы возможно двумя молекулами аскорбиновой кислоты.

Пероксидаза хрена способна катализировать окисление органических соединений не только перекисью водорода, но в отдельных случаях и кислородом воздуха [20]. Обладая широкой суб-

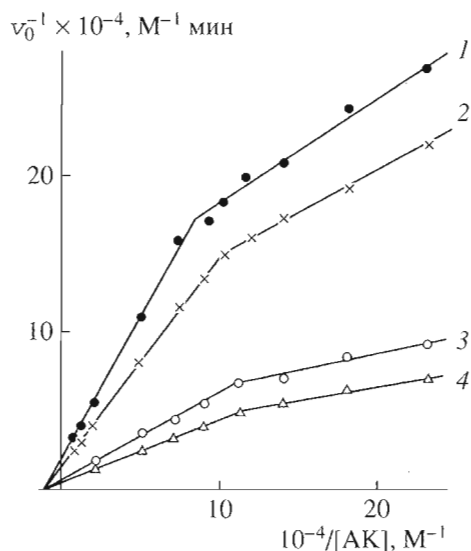


Рис. 5. Зависимости Лайнуивера–Берка для пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты при pH 5.5 в присутствии гидрохинона. Концентрации: пероксидаза – 94 нМ, перекись водорода – 0.64 мМ, АК – 2.2–176 мкМ, гидрохинон – 0 (1), 2 (2), 8 (3) и 12 мкМ (4).

стратной специфичностью, фермент катализирует окисление неорганических и органических соединений в присутствии перекиси водорода. Существует предположение, что для выполнения столь разнообразных функций у фермента имеется два различных активных центра [21, 22]. В некоторых реакциях для проявления каталитической активности пероксидазы требуются ионы металлов, такие как Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} или сложные органические соединения, вступающие во временное взаимодействие с ферментом. Проявление ответной реакции пероксидазы на различные соединения, которые могут активировать или ингибировать фермент, позволяет отнести его к числу регуляторных [4]. Поэтому активирование пероксидазы в реакциях индивидуального и совместного пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты высокими концентрациями субстрата и гидрохинона позволяет предположить наличие вблизи активного центра регуляторного участка, связывание с которым субстратов может повышать или понижать активность фермента.

В заключение следует особо подчеркнуть биологическое значение наблюдаемого эффекта активации пероксидазы в реакциях окисления медленно окисляемого субстрата в присутствии быстро окисляемого и ингибирование активности фермента высокими концентрациями субстрата. Выявленные закономерности позволяют понять механизм действия большого количества соединений, используемых в предпосевной обработке семян и обладающих стимулирующим, ретардантным, ингибирующим действием в отдельности, а также в различных сочетаниях [23]. Пероксидаза входит в состав комплекса ферментов, катализирующих окисление различных соединений, используемых в аэробных метаболических процессах, интенсивность которых возрастает в процессе набухания и прорастания семян. До сих пор являются спорными вопросы, касающиеся эффектов активирования всхожести семян низкими концентрациями ряда соединений и понижения их всхожести при использовании высоких концентраций тех же веществ. На основании полученных данных мы можем предложить механизм участия пероксидазы в этих процессах. Поскольку фермент является показателем протекания аэробных метаболических процессов в семенах, активность фермента увеличивается при их прорастании и можно считать, что понижение активности пероксидазы служит критерием углубления состояния покоя семян [4]. Поэтому аскорбиновая кислота и гидрохинон в высоких концентрациях, понижая активность пероксидазы, могут способствовать переключению аэробных метаболических процессов на анаэробные, что будет проявляться в углублении покоя семян и понижении всхожести. Низкие концентрации субстратов пероксидазы при их совместном присутствии, напротив, спо-

собны активировать фермент, увеличивая скорость протекания аэробных метаболических процессов, обеспечивая переход семян из покоя в активное состояние, увеличивая их энергию прорастания и всхожесть.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использовали пероксидазу хрена производства "Reanal" (Венгрия) со спектральным показателем чистоты $RZ = 1.0$. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически (ϵ 100 $M^{-1} cm^{-1}$ [24]) и по пиридингемохромогену [25]. В качестве субстратов применяли аскорбиновую кислоту и гидрохинон от фирмы "Serva" (Германия). Концентрацию перекиси водорода "Реахим" (Россия) определяли спектрофотометрически (ϵ_{230} 72.7 $M^{-1} cm^{-1}$) [26].

Методы. Реакцию окисления аскорбиновой кислоты (2.2–352.0 μM) и гидрохинона (1–230 μM) перекисью водорода (0.64 mM) проводили при 25°C в среде 0.1 M Na-ацетатного (pH 4.0–6.0) или Na-фосфатного (pH 6.0–8.0) буфера в присутствии пероксидазы хрена. Окисление аскорбиновой кислоты регистрировали по уменьшению поглощения при 265 нм (ϵ 7000 $M^{-1} cm^{-1}$ [18]), а гидрохинона при 290 нм (ϵ 2200 $M^{-1} cm^{-1}$). Кинетические кривые записывали на двухлучевом спектрофотометре DMS 100 S фирмы "Varian" (США). За единицу активности фермента принимали его количество, при котором за 1 мин окисляется 1 μM субстрата (аскорбиновой кислоты или гидрохинона). Кажущиеся константы скорости окисления аскорбиновой кислоты определяли из данных по стационарной кинетике [19].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. М.: Мир, 1986. Т. 1. С. 392.
2. Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. // Успехи соврем. биологии. 1993. Т. 113. С. 456–470.
3. Buettner G.R., Moseley P.L. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 9784–9788.
4. Андреева В.А. Фермент пероксидаза. М.: Наука, 1988. С. 129.
5. Запрометов М.Н., Ермакова С.А., Арзуманян В.Т. // Биохимия. 1985. Т. 50. С. 302–311.
6. Барабай В.А. Растительные фенолы и здоровье человека. М.: Наука, 1984. С. 160.
7. Аверьянов А.А., Исмаилов А.И. // Биол. науки. 1986. № 5. С. 76–78.
8. Плешков Б.П. Биохимия сельскохозяйственных растений. М.: Агропромиздат, 1987. С. 494.
9. Foyer Ch., Rowell J., Walker D. // Planta. 1983. V. 157. P. 239–245.
10. Чупахина Г.Н., Залыцева М.В., Сивцова А.М. Фотосинтез и продуктивность растений. Калининград: Калининградский ун-т, 1987. С. 96.

11. *Jensem W.A., Kavaljian L.G.* // J. Biophys. Biochem. Cytology. 1956. V. 2. P. 87–92.
12. *Grob K., Matile Ph.* // Z. Pflanzenphysiol. 1980. V. 98. P. 235–239.
13. *Paciolla C., Stefan A., Di Gara L.* // Bell. Soc. Ital. Biol. Sper. 1991. V. 67. P. 699–706.
14. *Матусис И.И.* // Витамины / Ред. М.И. Смирнова. М.: Медицина, 1974. С. 384–414.
15. *Ugarova N.N., Lebedeva O.V., Berezin I.V.* // J. Mol. Catal. 1981. V. 13. P. 215–225.
16. *Лебедева О.В., Угарова Н.Н.* // Изв. РАН. Сер. хим. 1996. № 1. С. 25–32.
17. *Рогожин В.В., Верхотуров В.В.* // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 1686–1690.
18. *Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.* Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. С. 99–100.
19. *Березин И.В., Клесов А.А.* Практический курс химической и ферментативной кинетики. Гл. 2. М.: МГУ, 1976.
20. *Березин И.В., Угарова Н.Н., Дмитриева-Гетлинг М.П., Кершенгольц Б.М.* // Биохимия. 1975. Т. 40. С. 475–483.
21. *Рамазанова Л.Х., Мифтахутдинова Ф.Г., Алексеева В.Я.* // Биохимия. 1971. Т. 36. С. 67–71.
22. *Siegel B.Z., Galston A.W.* // Science. 1967. V. 157. P. 1557–1559.
23. *Михно А.Н., Минакова С.Г., Харченко Л.В.* // Физиология и биохимия культ. растений. 1997. Т. 29. С. 107–114.
24. *Ogawa S., Shira Y., Morishima I.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1979. V. 90. P. 674–678.
25. *Falk J.E.* Porphyrins and metalloporphyrins. Amsterdam: Elsevier, 1964.
26. *George P.* // Biochem. J. 1953. V. 54. P. 267–276.

The Mechanism of Ascorbic Acid and Hydroquinone Cooxidation Catalyzed by Horseradish Peroxidase

V. V. Rogozhin[#] and V. V. Verkhoturov

Yakutsk State Agricultural Academy, ul. Krasil'nikova 15, Yakutsk, 677002 Russia

A steady-state kinetics of peroxidase cooxidation of ascorbic acid and hydroquinone catalyzed by horseradish peroxidase was studied. Ascorbic acid and hydroquinone were shown to be oxidized successively, and hydroquinone promoted the oxidation of ascorbic acid. Excess ascorbic acid inhibited peroxidase in the cooxidation of the substrates at pH 5–7. The values of catalytic constants (k_{cat} , K_m , and K_a) were determined. A possible activation mechanism of the peroxidation of ascorbic acid in the presence of hydroquinone was suggested, and its biological significance was considered.

Key words: ascorbic acid, horseradish peroxidase, hydroquinone

[#] *To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (4112) 25-8479; fax: +7 (4112) 26-4949.*