

[Yakovishin L.A., Kuznetsova A.L., Rubinson M.A., Korzh E.N. Determination of the triterpene glycosides in the medicinal preparation hedelix by TLC. *Farm. Zhurn.*, 2006, vol. 6, pp. 62-65. (In Ukr.)]

8. Яковишин Л.А., Вожжова М.А., Кузнецова А.Л., Гришковец В.И. Исследование тритерпеновых гликозидов лекарственного препарата проспан®. *Журн. орг. и фарм. химии*, 2005, т. 3, вып. 1 (9), с. 57-59. [Yakovishin L.A., Vozhzhova M.A., Kuznetsova A.L., Grishkovets V.I. Study of triterpene glycosides of the drug prospan®. *Zhurn. Org. Farm. Khim.*, 2005, vol. 3, iss. 1 (9), pp. 57-59. (in Russ.)]

ЛАККАЗНОЕ ОКИСЛЕНИЕ МНОГОАТОМНЫХ ФЕНОЛОВ

Ревенко Д.К., Бовт Е.А., Кравченко Е.М., Дорошкевич В.С., Одарюк И.Д., Баранова О.В.

Донецкий национальный университет

ул. Университетская, 24, г. Донецк, 283001, Украина

e-mail: bio-chem@mail.ru

Аннотация. Проведено изучение оптимальных условий действия фермента лакказы *Trametes Versicolor*, определен оптимум pH и температуры. Рассчитаны максимальная скорость реакции V_{max} , константа Михаэлиса-Ментен K_m и эффективная константа скорости k_{cat} для потенциальных субстратов лакказы. Проведено сопоставление активности лакказы в реакции окисления изучаемых субстратов.

Ключевые слова: лакказа, окисление, оптимум pH, фенолы, медиаторы лакказного окисления, спектрофотометрия.

LACCASE OXIDATION OF THE POLYHYDRIC PHENOLS

Revenko D.K., Bovt E.A., Kravchenko E.M., Doroshkevich V.S., Odaryuk I.D., Baranova O.V.

Donetsk National University

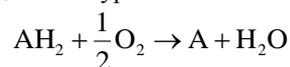
Universitetskaya St., 24, Donetsk, 283001, Ukraine

e-mail: bio-chem@mail.ru

Annotation. The study of the optimal conditions for the action of the enzyme laccase *Trametes Versicolor*. The pH and temperature optimum was been identified. The maximum reaction rate V_{max} , Michaelis-Menten constant K_m , and k_{cat} effective rate constant with the potential substrates for laccase have been calculate. The laccase activity in the reaction of substrate oxidation has been done.

Key words: laccase, oxidation, optimum pH, phenols, mediators of laccase oxidation, spectrophotometry.

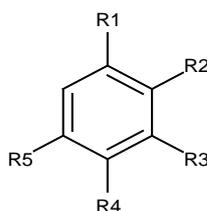
Введение. В настоящее время одной из актуальных проблем ферментативного катализа и биотехнологии является изучение каталитических свойств лакказ, выделенных из грибов [1-3]. Известно, что эти ферменты эффективно разрушают лигнин, извлекая из растительных объектов низкомолекулярные вещества, обладающие в том числе и антиоксидантными свойствами. Лакказа (*п.*-дифенол: кислород оксидоредуктаза) относится к группе медьсодержащих оксидаз, катализирующих восстановление молекулярного кислорода до воды. В качестве восстановителей используются различные по природе соединения, которые выступают субстратами лакказы. Формально этот процесс можно представить уравнением:



Лакказа гриба *Trametes Versicolor*, находит широкое применение в самых разных технологических процессах, благодаря высокой удельной активности и относительно низкой субстратной специфичности [4]. Это значит, что число субстратов, которые фермент может использовать в качестве восстановителей кислорода, может определяться широким кругом органических веществ.

Целью данной работы является расширение круга субстратов лакказного окисления и получение кинетических параметров окисления возможных субстратов фермента, определение оптимумов температуры и pH лакказы *Trametes Versicolor*.

Экспериментальная часть. В качестве объектов исследования ферментативной реакции окисления использовались двух-, трехатомные фенолы: пирокатехин (1), гидрохинон (2), метилгидрохинон (3), трет.-бутилгидрохинон (4), 4-трет.-бутил – пирокатехин (5), резорцин (6), пирогаллол (7), флороглюцин (8).



$R_1=R_2=OH, R_3=R_4=R_5=H$ – пирокатехин (1)

$R_1=R_4=OH, R_2=R_3=R_5=H$ – гидрохинон (2)

$R_1=R_4=OH, R_3=R_5=H, R_2=CH_3$ – метилгидрохинон (3)

$R_1=R_4=OH, R_3=R_5=H, R_2=(CH_3)_3C$ – трет.-бутилгидрохинон (4)

$R_1=R_2=OH, R_3=R_5=H, R_4=(CH_3)_3C$ – 4-трет.-бутил – пирокатехин (5)

$R_1=R_3=OH, R_2=R_4=R_5=H$ – резорцин (6)

$R_1=R_2=R_3=OH, R_4=R_5=H$ – пирогаллол (7)

$R_1=R_3=R_5=OH, R_2=R_4=H$ – флороглюцин (8)

Контроль за скоростью реакции осуществляли спектрофотометрическим методом по убыли реактанта или накоплению продукта реакции. Кинетические исследования проводили в термостатируемых кварцевых кюветах, снабженных системой перемешивания. Все кинетические исследования проводили в цитратном буферном растворе pH 4,6 при $308 \pm 0,1$ К. Исследования выполнены на приборе Specord S – 300 (Германия). Концентрацию соединений в исследуемой пробе определяли, используя коэффициенты экстинкции, полученные из калибровочных графиков. Начальную скорость ферментативного окисления рассчитывали по тангенсу угла наклона начального линейного участка кинетических кривых. Параметры ферментативного процесса вычисляли из уравнений линейной регрессии, полученных из зависимостей начальной скорости окисления от концентрации исследуемых соединений в двойных обратных координатах. Для расчетов использовали уравнение Лайнуивера-Берка:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max} [S]_0} + \frac{1}{V_{max}}$$

где V_0 – начальная скорость реакции ($M \cdot c^{-1}$); K_m – константа Михаэлиса-Ментен (M); $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата (M); V_{max} – максимальная скорость реакции [$M \cdot c^{-1}$].

Для определения оптимума pH лакказы *Trametes Versicolor* использовали набор цитратных и фосфатных буферных растворов с интервалом pH 3,5-7,0. Для определения температурного оптимума действия лакказы кинетические измерения проводили в диапазоне 296-323 К с шагом измерения 5 К. В качестве субстрата лакказы для определения оптимумов температуры и pH использовали гидрохинон с исходной концентрацией $2,0 \cdot 10^{-4}$ M. За кинетикой реакции следили спектрофотометрическим методом по уменьшению концентрации гидрохинона при $\lambda=288$ нм. Активность лакказы характеризовали величиной константы скорости $k_{кат}$, c^{-1} ферментативного окисления гидрохинона.

Результаты и их обсуждение. Известно, что активность ферментов значительно зависит от значения pH и температуры. В связи с этим были проведены предварительные опыты, в которых установлен pH оптимум фермента на примере реакции ферментативного окисления гидрохинона. Показано, что начальная скорость лакказного окисления гидрохинона зависит от значения pH реакционной среды. Зависимость максимальной скорости окисления V_{max} гидрохинона от pH реакционной смеси, имеет классический для ферментативных реакций колоколообразный вид. Было установлено, что оптимум pH лакказы *Trametes Versicolor* равен 4,6.

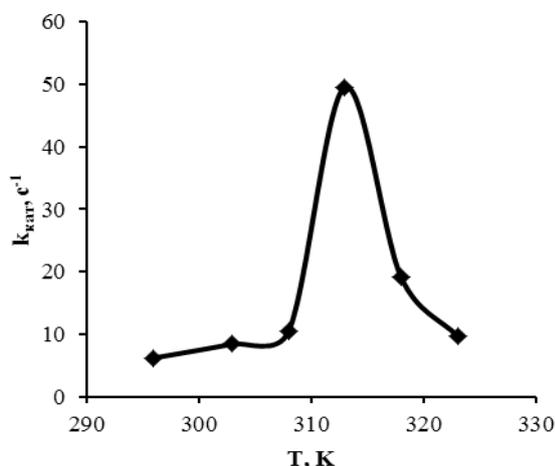


Рисунок 1 – Зависимость максимальной скорости реакции лакказного окисления гидрохинона от температуры среды. $[E]_0=4.0$ мг/л, цитратный буферный раствор $pH = 4,6$

На рисунке 1 приведена зависимость максимальной скорости окисления гидрохинона от температуры (Т) реакционной смеси. Как видно из рисунка 1, каталитическая активность лакказы *Trametes Versicolor* имеет наибольшее значение при температуре 313 К в цитратном буферном растворе $pH = 4,6$. За реакцией окисления гидрохинона и его производных следили по кинетике расходования реактантов, а за окислением пирокатехина, флороглюцина – по кинетике накопления продуктов.

Продуктами лакказного окисления *o.*- и *n.*-замещенных дигидроксибензолов пирогаллола являются соответствующие хиноны. Кинетические кривые накопления продукта реакции имеют вид кривых с насыщением (см. рис. 2), а кривые расходования субстрата монотонно убывают по ходу процесса (см. рис.3). Кинетические зависимости прямых в обратных двойных координатах (метод Лайнуивера – Берка) являются линейными для всех субстратов (1-8).

Основные кинетические параметры изучаемых процессов – максимальная скорость реакции V_{max} , константа Михаэлиса K_m , эффективная константа скорости $k_{кат}$ представлены в таблице 1.

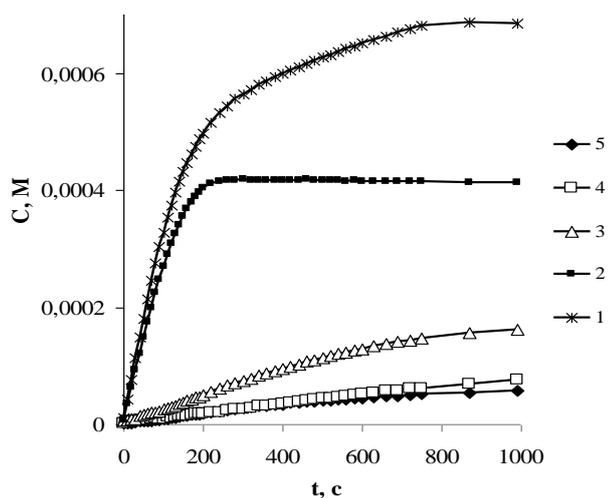


Рисунок 2 – Кинетические кривые накопления продукта окисления 4-трет.-бутилпирокатехина молекулярным кислородом в присутствии лакказы.

Цитратный буфер pH=4.6, 308 К, $[E]_0=20$ мг/л.
[4-трет.-бутилпирокатехин] $_0$: 1. – 0,6 мМ; 2. – 0,36 мМ;
3. – 0,204 мМ; 4. – 0,12 мМ, 5.– 0,06 мМ

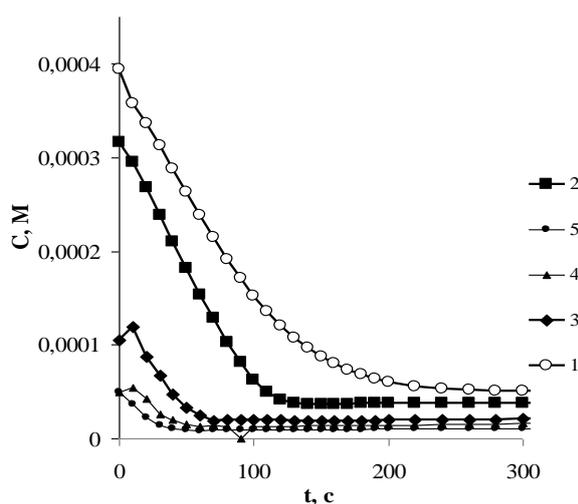


Рисунок 3 – Кинетические кривые расходования при окислении метилгидрохинона молекулярным кислородом в присутствии лакказы. Цитратный буфер pH=4.6, 308 К, $[E]_0=20$ мг/л. [Метилгидрохинон] $_0$: 1. – 0,6 мМ; 2. – 0,36 мМ; 3. – 0,204 мМ; 4. – 0,12 мМ, 5. – 0,06 мМ

Таблица 1 – Кинетические параметры лакказного окисления многоатомных фенолов (цитратный буферный раствор pH 4.6, 308 К)

№	Субстраты лакказы	V_m мкМ*с ⁻¹	K_m , мМ	$k_{кат}$, с ⁻¹	λ , нм
1	Пирокатехин	6,50	0,73	21,7	275
2	Гидрохинон	2,54	0,53	8,5	288,5
3	Метилгидрохинон	5,81	0,26	19,4	288
4	Трет.-бутилгидрохинон	2,41	0,02	8,0	289
5	4-трет.-бутилпирокатехин	0,16	0,37	5,4	400
6	Пирогаллол	2,24	0,41	7,5	410
7	Резорцин	0,05	0,12	1,6	275
8	Флороглюцин	1,03	0,19	3,4	266,5

Как видно из данных таблицы, все изученные многоатомные фенолы являются эффективными восстановителями молекулярного кислорода в ферментативном процессе. Значение $k_{кат}$ не сильно изменяется при варьировании структуры двухатомных фенолов. *o*-замещенные фенольные соединения являются более лучшими субстратами для лакказы *Trametes Versicolor*, чем *m*- и *p*-, что коррелирует с литературными данными [4]. Лакказа *Trametes Versicolor* на порядок быстрее катализирует окисление двухатомных фенолов, чем трехатомных. Наиболее оптимальными субстратами лакказного окисления оказались метилгидрохинон и пирокатехин.

Список литературы / References:

- Горшина Е., Бирюков В., Русинов Т. [и др.] Способ получения ферментного препарата лакказы, 2009, Патент РФ RU 2349644, С2, 2009.03.20, 5 с. [Gorshin E., Biryukov V., Rusinov T. [et al.] A method for producing an enzyme preparation laccase, 2009, Russian Patent RU 2349644, C2, 2009.03.20, 5 p.]
- Горбачева М.А., Шумакович Г.П., Морозова О.В. [и др.] Сравнительное изучение биокаталитических реакций с участием высоко- и низкочастотных грибных и древесной лакказ в гомогенных и гетерогенных реакциях. *Вестн. МГУ, сер. 2, Химия*, 2008, т. 49, № 2, с. 117-121. [Gorbacheva M.A., Shumakovich G.P., Morozova O.V. [et al.] Comparative studies of biocatalytic reactions of high- and low-redox potential laccases in homogeneous and heterogeneous reactions. *Vestn. MGU, iss. 2, Khimiia*, 2008, vol. 49, pp. 117-121. (In Russ.)]
- Шлеев С.В. *Функционирование, механизм регуляции активности и возможное практическое использование голубых медьсодержащих оксидаз*. Автореферат дисс. ... на соискание ученой степени д-ра хим. наук по спец. 03.01.04. «Биохимия», М., 2010, 51 с. [Shleev S.V. *The operation, the regulation mechanism of activity and the possible practical use of blue copper oxidases*. Abstract of the diss. ... Doctor of special sciences 03.01.04. "Biochemistry", М., 2006, 51 p. (In Russ.)]
- Морозова О.В. *Лакказы базидиальных грибов, лакказа-медиаторные системы и возможности их использования*. Автореферат дисс. ... канд. хим. наук по спец. 03.01.04. «Биохимия», М., 2006, 25 с. [Morozova O.V. *Laccases of basidiomycetes, laccase-mediator systems and the possibility of their use*. Abstract of the thesis for the degree of PhD by special sciences 03.01.04. "Biochemistry", М., 2006, 25 p. (In Russ.)]