



УДК 541.183:577.152.111\*17.03

## ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ

### I. ВЛИЯНИЕ АНИОННЫХ ПАВ

© 1998 г. А. И. Давлетшин, В. В. Егоров<sup>#</sup>, В. П. Zubov\*Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И.Скрябина,  
109472, Москва, ул. Скрябина, 23;

\*Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 15.04.97 г. Принята к печати 25.02.98 г.

Исследовано влияние различных анионных поверхностно-активных веществ (ПАВ) на начальную скорость перекисного окисления 5-аминосалициловой кислоты в присутствии пероксидазы из хрена. С ростом концентрации ПАВ эта скорость сначала уменьшается, затем возрастает и далее снова уменьшается. Первичное снижение скорости мы связываем с ингибированием фермента, последующее повышение – с изменением его конформации и с увеличением доступности его активного центра для субстрата, а вторичное уменьшение активности – с денатурацией белка.

*Ключевые слова:* пероксидаза хрена, анионные ПАВ.

Взаимовлияние белков и липидов является ключом к пониманию механизма многих функций клеточных мембран. Моделировать такое влияние можно с помощью системы “фермент – поверхностно-активное вещество (ПАВ)”. Из литературы известно, что анионные поверхностно-активные вещества в одних случаях активируют ферменты [1–3], в других ингибируют [4], в третьих приводят к их денатурации [5, 6]. Целью настоящей работы было систематическое изучение этих эффектов на примере пероксидазы хрена (КФ 1.11.1.7) и анионных ПАВ.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 и 2 представлены зависимости начальной скорости пероксидазного окисления от концентрации ПАВ. Видно, что для всех соединений, кроме масляной и валериановой кислот, кривые состоят из трех участков: начального снижения, повышения и повторного уменьшения скорости реакции.

Начальное уменьшение скорости мы предположительно связываем с конкуренцией между ПАВ и субстратом за место связывания в области активного центра пероксидазы [7]. На связывание ПАВ указывает существенное ускорение его перекисного окисления в присутствии пероксидазы (табл. 1).

Данные, приведенные на рис. 1, показывают, что с уменьшением длины углеводородного радикала в молекуле ПАВ его ингибирующая активность возрастает. Этот результат можно объяснить тем, что меньшие молекулы ПАВ лучше отвечают полости в районе активного центра и прочнее в ней связываются. В то же время очень малые молекулы валериановой и масляной кислот не ингибируют пероксидазу (см. кривые 2 и 3 на рис. 2). Отсюда следует, что у оптимального ингибитора молекула в точности соответствует по размеру предполагаемой полости в молекуле фермента.

Возрастание скорости реакции на втором участке мы связываем с тем, что под влиянием ПАВ

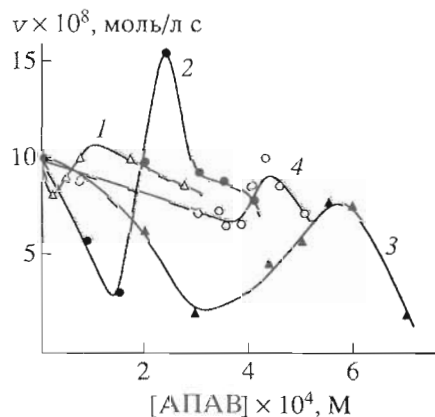


Рис 1. Зависимость активности пероксидазы от концентрации соединений. 1 – (I), 2 – (II), 3 – (IV), 4 – (VI). [E]  $3 \times 10^{-8}$  М, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]  $3 \times 10^{-3}$  М, [S]  $3 \times 10^{-3}$  М (рН 7.2; 20°С).

<sup>#</sup> Автор для переписки.

изменяется конформация фермента и/или увеличивается доступность его активного центра для субстрата (ср. [8]). Если это предположение справедливо, то подобный эффект должен особенно проявиться в области критической концентрации мицеллообразования ПАВ. Действительно, эти концентрации (табл. 2) в ряде случаев расположены в соответствующих областях концентрационной зависимости скорости ферментативной реакции.

Известен, однако, и другой механизм влияния ПАВ на белки, который объясняет увеличение активности ферментов их включением в ассоциаты ПАВ и последующим изменением конформации под влиянием окружающих молекул [2]. В нашем случае мы не можем исключить участие и этого механизма, так как образование ассоциатов пероксидазы с ПАВ мы обнаружили по изотермам “давление – площадь” для смешанных монослоев на границе вода – воздух (рис. 3, ср. [9]). На изотерме такого смешанного монослоя имеется плато при давлении 9 мН/м, которое отличается от давлений коллапса монослоев отдельных веществ. При этом наблюдается уплотнение монослоя. Это можно истолковать как появление новой фазы – по всей видимости, смешанных структур белок – ПАВ [10]. Следует отметить, что давление коллапса таких ассоциатов находится в диапазоне “биологических” давлений в природных мембранах (7–32 мН/м) [11].

Сочетание обоих механизмов влияния ПАВ на белок позволяет объяснить особенности поведения пероксидазы на участке роста скорости при увеличении концентрации ПАВ (рис. 1). Как видно на рисунке, наклон концентрационной зависимости сначала возрастает, а потом снижается при увеличении длины алифатического радикала в молекуле ПАВ. Известно, что с ростом цепи увеличивается как поверхностная активность ПАВ, так и прочность и плотность его мицелл. Судя по нашим данным, первый из указанных факторов, по-видимому, превалирует для короткоцепочечных соединений в области низких концентраций, а второй оказывается решающим для длинноцепочечных ПАВ в районе критической концентрации мицеллообразования.

Встречное действие обоих факторов приводит к тому, что с точки зрения активирующего влияния на фермент оптимально соединение (III). С ним наблюдается наибольший наклон концентрационной зависимости скорости ферментативной реакции на участке ее роста, а также максимальное значение этой скорости в конце данного участка.

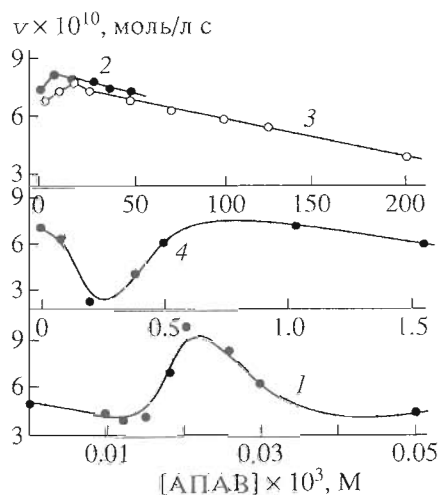
Уменьшение скорости ферментативной реакции на третьем участке (рис. 1), по всей вероятности, связано с денатурацией фермента под влиянием высоких концентраций ПАВ. Такой эффект

**Таблица 1.** Скорость реакции перекисного окисления ПАВ в воде ( $v \times 10^{10}$  моль/л с; [ПАВ] 0.1 М,  $[H_2O_2]$  0.26 М, 20°C)

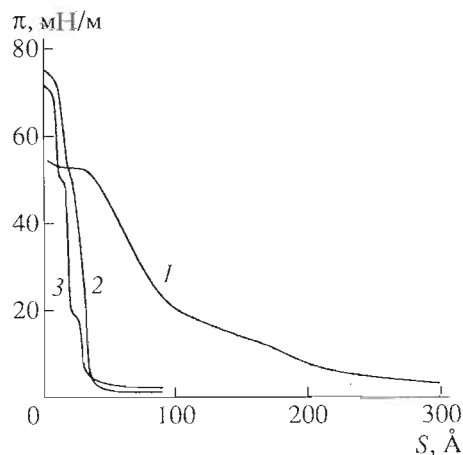
ПАВ	Без пероксидазы	С пероксидазой (2.5 мМ)
(II)	1.6	4.3
(V)	3.1	7.3

известен из литературы [6], однако в отличие от описанного в ней случая здесь речь идет об обратимой денатурации, поскольку мы показали, что уменьшение концентрации соединений (I)–(VI) вызывает полное восстановление активности фермента.

Наклон этого участка для всех длинноцепочечных ПАВ оказывается сравнимым и существ-



**Рис. 2.** Зависимость активности пероксидазы от концентрации ПАВ. 1 – (II), 2 –  $C_3H_7COOH$ , 3 –  $C_4H_9COOH$ , 4 – (VII). Условия – см. рис. 1



**Рис. 3.** Изотермы “поверхностное давление–площадь на молекулу” на границе вода–воздух для монослоев пероксидазы (1), соединения (V) (2) и смешанного монослоя пероксидаза–соединение (V) (3) (рН 6.8; 20°C).

**Таблица 2.** Критические концентрации мицеллообразования ПАВ в водном фосфатном буфере (0.03 М, рН 7.2) и концентрации, соответствующие максимальной активности фермента в присутствии ПАВ (20°C)

ПАВ	(I)	(IV)	(VI)
ККМ × 10 <sup>4</sup> , М	25	3.3	2.5
[ПАВ] × 10 <sup>4</sup> , М	1	2.5	4.5

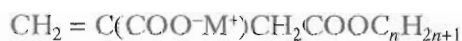
венно большим, чем с короткоцепочечными соединениями (рис. 2). Это позволяет предположить различия в механизмах денатурации белка под влиянием гидрофильных и гидрофобных ПАВ.

Таким образом, зависимость активности пероксидазы хрена от концентрации анионных ПАВ в значительной степени универсальна. Следует подчеркнуть, что ее характер остается практически неизменным как при изменении строения ПАВ в ряду однотипных соединений, так и при переходе к соединениям другой природы. Некоторые различия, например отсутствие первого участка для алифатических кислот, могут быть связаны с особенностями данных соединений, в частности с их чрезвычайно низкой поверхностной активностью и высокой растворимостью в воде.

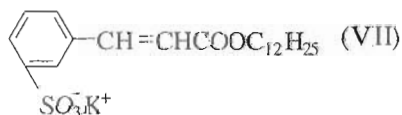
В заключение нужно отметить, что наш выбор ПАВ не случаен. Большинство исследованных соединений содержит способные к полимеризации непредельные группы, что открывает возможности их практического применения, например для получения полимерных носителей лекарственных препаратов в организме [12, 13].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Соединения (I)–(VII), синтезированные на химском факультете МГУ, по данным ПМР, содержали менее 1% примесей.



$n = 8, \text{M} = \text{Na}$  (I);  $n = 12, \text{M} = \text{K}$  (II);  $n = 12, \text{M} = \text{Na}$  (III);  $n = 16, \text{M} = \text{Na}$  (IV);  $n = 16, \text{M} = \text{K}$  (V);  $n = 18, \text{M} = \text{Na}$  (VI)



В работе использованы масляная и валериановая кислоты (Fluka), калиевые соли фосфорной кислоты (ч.) без дополнительной очистки, 5-аминосалициловая кислота (х.ч.), пероксидаза хрена (Reanal) и дважды дистиллированная вода.

Реагенты прибавляли в следующем порядке: в фосфатном буфере (0.1 М, рН 7.2) растворяли фермент ( $3 \times 10^{-8}$  М), субстрат ( $3 \times 10^{-3}$  М) [14] и ПАВ, а спустя 10 мин прибавляли перекись водорода ( $3 \times 10^{-3}$  М) [14].

Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически ( $\lambda$  403 нм,  $\epsilon$   $10.21 \times 10^4$  М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> [15]), а перекиси водорода – перманганатометрически [16].

За накоплением окрашенных продуктов окисления при 20°C следили спектрофотометрически ( $\lambda$  455 нм,  $\epsilon$   $4.5 \times 10^4$  М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> [17]).

Поверхностное натяжение растворов ПАВ в фосфатном буфере при 20°C определяли методом Вильгельми [18] с помощью торсионных весов типа ВТ.

Изотермы “давление – площадь” монослоев на границе вода – воздух при 20°C получены на установке FW 1 (Lauda, Германия) при скорости сжатия 1.5 см/мин.

Хемилюминесценция измерялась при 20°C на хемилюминесцентном приборе производства кафедры биофизики МГАВМиБ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hanozet G., Simonetta M., Barisio D., Guerritore A. // Arch. Biochem. Biophys. 1979. V. 196. P. 46–53.
2. Левашов А.В. // Итоги науки и техники. Биотехнология. М.: ВИНТИ, 1984. Т. 4. С. 112–158.
3. Клячко Н.Л., Левашов А.В., Мартинек К. // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. С. 1019–1033.
4. Афиногенов Г.Е., Панарин Е.Ф. Антимикробные полимеры. СПб.: Гиппократ, 1993. С. 138–180.
5. Cleveland D.W., Fisher S.G., Kirschner M.W., Laemmli U.K. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 1102–1106.
6. Жали М. Физическая денатурация белков. М.: Наука, 1968. С. 41–44.
7. Газарян И.Г. // Итоги науки и техники. Биотехнология. М.: ВИНТИ, 1992. Т. 36. С. 28–53.
8. Марданян С.С., Григорян М.Л. // Биохимия. 1995. Т. 60. С. 1055–1061.
9. Robinson N., Tanfold Ch. // Biochemistry. 1975. V. 14. P. 369.
10. Клямкин А.А. Структурообразование и радикальная полимеризация в монослоях поверхностно-активных мономеров; Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ, 1992. С. 133–136.
11. Часовникова Л.В. // Иммунология. 1992. Т. 1. С. 23–25.
12. Aniansson E.A.G., Wall S.N. // J. Phys. Chem. 1976. V. 80. P. 905–908.

13. Егоров В.В., Аляутдин Р.Н., Харкевич Д.А. // Вопросы физико-химической биологии в ветеринарии. М.: МГАВМиБ, 1995. С. 67–72.
14. Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. // Биохимия. 1981. Т. 46. Вып. 7. С. 1202–1209.
15. Smith K.M. Porphyrins and Metalloproteins. Amsterdam: Elsevier, 1975. P. 757–803.
16. Новиков В.Е., Леонова Л.А., Литвишко В.С. Лабораторный практикум по аналитической химии. М.: МВА им. Скрыбина, 1994. С. 42–47.
17. Метелица Д.И., Гирина Н.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 1995. Т. 31. С. 617–624.
18. Абрамзон А.А., Боброва Л.Е. Поверхностные явления и ПАВ. Л.: Химия, 1984. С. 166.

## Effect of Surfactants on Peroxidase Activity. I. Effect of Anionic Surfactants

A. I. Davletshin\*, V. V. Egorov\*#, and V. P. Zubov\*\*

\*Skryabin State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, ul. Skryabina 23, Moscow, 109472 Russia

\*\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

The effect of various anionic surfactants on the initial rate of 5-aminosalicylic acid peroxidation with horseradish peroxidase was studied. With increasing surfactant concentration, this rate first decreased, then increased, and again decreased. We conclude that these changes were due to an inhibition of the enzyme, a subsequent change in the enzyme conformation accompanied by the enhanced accessibility of its active site to the substrate, and the final protein denaturation, respectively.

*Key words:* horseradish peroxidase, anionic surfactants

---

# To whom correspondence should be addressed.