

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Л. А. НИКОЛАЕВ и Н. И. КОБОЗЕВ

ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ КАТАЛАЗЫ В АДсорбЦИОННОМ СЛОЕ

(Представлено академиком С. С. Наметкиным 16 VII 1946)

Каталитическая активность молекулы катализатора зависит не только от ее внутренней структуры, но и от взаимодействия с другими такими же молекулами. Это взаимодействие, как было показано в ряде работ одного из авторов (1-3) для случая адсорбционных катализаторов, может приводить к возникновению высокоактивных группировок — активных ансамблей на поверхности носителя. Признаком появления активного ансамбля является прохождение удельной активности ката-

Таблица 1

Графит (1 г) + 10 см³ буфера + каталаза (препарат № 1) + 40 см³ 0,01 N перекиси водорода; *t* = 12° С. Удельная активность отнесена к 0,01 см² раствора каталазы. Средняя удельная активность этого препарата в растворе равнялась 2,20 (в тех же единицах)

Количество раствора каталазы на 1 г графита в см ³	Общая активность в см ³ 0,01 N KMnO ₄ за 5 мин.	Удельная активность на 0,01 см ² раствора каталазы
0,02	3,40	1,70
0,03	4,30	1,43
0,04	5,5	1,27
0,05	5,7	1,14
0,08	5,9	0,74
0,10	6,1	0,61
0,15	9,5	0,63

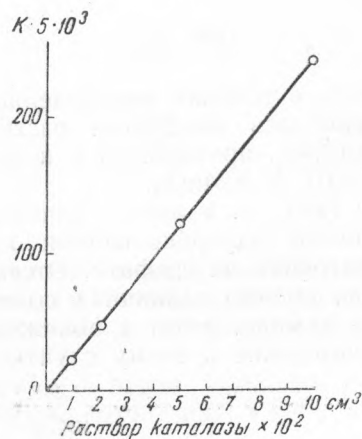


Рис. 1

литического материала, нанесенного на какой-либо носитель, через максимум при некотором заполнении поверхности.

Наряду с этим, нами было найдено (4), что железопорфириновый комплекс — гемин, будучи нанесен на уголь, не дает максимума удельной каталазной активности, а показывает ее непрерывный рост по мере разведения слоя. Отсюда, по теории активных ансамблей, следует, что наибольшей активностью на угле обладает единичная молекула гемина, ассоциация же этих молекул в адсорбционном слое есть фактор подавляющий и даже полностью убивающий их активность. Важно было выяснить, обладает ли теми же свойствами также и каталаза, частью

протестической группы которой является гемин. Мы получили печеночную каталазу по способу Баттелли и Штерн (5).

Полученный препарат был дополнительно очищен адсорбцией на каолине и элюирован $\frac{1}{15} M Na_2HPO_4$. Этот раствор смешивался с раствором KH_2PO_4 так, что pH смеси равнялся 7,1 и буферная система использовалась для опытов.

Препарат обнаружил отчетливую линейную зависимость активности (в виде константы первого порядка k) от концентрации (рис. 1, ср. также (6)).

Полученный препарат каталазы был адсорбирован порошком графита, хорошо адсорбирующим этот фермент. Графит в количестве 1 г. вводился в колбу шюттель-аппарата (в термостате). Добавлялось 10 см^3 буфера (pH=7,1), определенное число сотых долей см^3 раствора каталазы и, через 10 мин., — 40 см^3 раствора перекиси. Колба встря-

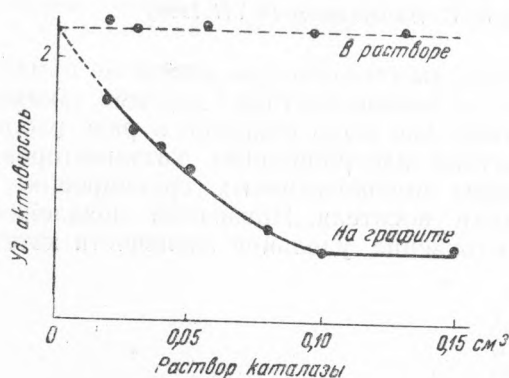


Рис. 2

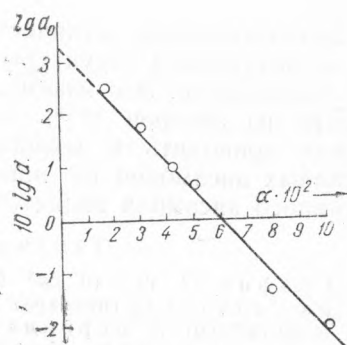


Рис. 3

живалась в течение определенного промежутка времени, затем реакция прекращалась введением раствора серной кислоты, графит быстро отсасывался, промывался и в фильтрате определялась H_2O_2 титрованием $0,01 N KMnO_4$.

Из табл. 1. и рис. 2 отчетливо видно резкое падение удельной активности адсорбированной каталазы с ростом ее поверхностной концентрации на графите. Отсюда следует, что в адсорбционном слое активна именно единичная молекула каталазы, а ассоциация, как и в случае гемина, ведет к понижению активности.

Применение к этому случаю уравнения теории ансамблей для $n = 1$

$$\log a = \log a_0 - \frac{P\alpha}{2,3},$$

где a — удельная активность, a_0 — то же при нулевом заполнении, α — заполнение в любых единицах, P — площадь миграционной ячейки, обнаруживает прекрасное согласие теории с опытом, т. е. дает строго линейную зависимость $\lg a$ от α (рис. 3). Экстраполяция до $\alpha = 0$ дает для a_0 значение 2,2, точно совпадающее с активностью каталазы в растворе, т. е. активность единичной молекулы каталазы одинакова как в растворе, так и на графите (α в см^3 кислорода на 1 г графита). Следовательно, фактором, понижающим активность адсорбированной каталазы, является исключительно взаимодействие соседних молекул фермента в адсорбционном слое, но не взаимодействие каталазы с носителем.

Мы показали ранее (4), что ассоциативная инактивация свойственна гемину; это позволяет думать, что молекулы каталазы соединяются друг с другом в адсорбционном слое своими геминовыми участками, в то время как белковые части молекул соединены с носителем (графитом).

Однако у соседних молекул каталазы имеется еще и вторая возможность взаимной инактивации: путем соединения геминовых участков одной молекулы с белковой частью другой. Реальность такого механизма следует из наблюдавшейся нами потери активности гемина, добавленного к каталазе*.

Небольшое количество раствора гемина в $\frac{1}{15} M Na_2HPO_4$ вообще не изменяет активности каталазы, т. е. гемин адсорбируется с полной потерей активности вследствие поглощения белковой частью препарата каталазы. Разумеется, нельзя утверждать, что эта белковая часть есть необходимый компонент ферона каталазы, а не относится к группе белковых примесей; можно напомнить, что молекулярный вес этого фермента колеблется в очень широких пределах: от 16 000 до 240 000.

Таблица 2

Препарат каталазы (№ 2) $0,02 \text{ см}^3 +$
 $+ \text{ гемин (2 мг) в } \frac{1}{15} M Na_2HPO_4; t = 18^\circ C;$
 $H_2O_2 \text{ } 0,05 N; \text{ pH раствора } 7,1. \text{ Актив-$
 ность в см^3 кислорода. Метод исследова-
 ния газометрический

Время от начала опыта в мин.	Каталаза	Гемин	Каталаза + гемин	То же при условии аддитивности
1	0,26	—	0,76	—
2	0,75	0,90	1,70	1,65
3	1,10	—	2,00	—
4	1,75	—	2,77	—
5	2,20	2,26	3,20	1,46
7	3,00	3,00	3,90	6,00
9	—	—	4,50	—
10	4,25	3,50	4,70	7,75

Как видно из табл. 2 и рис. 4, близость к аддитивности можно констатировать только в первые 2 минуты, завершение адсорбции гемина на белке уже через 5 минут уничтожает всякие следы аддитивности.

Адсорбируя на графите сначала гемин, а затем каталазу, можно наблюдать аналогичный эффект еще более отчетливо. Гемин легко адсорбируется графитом, и, вводя 5 мг гемина на 0,5 г графита, мы получили очень активный препарат. Дополнительная адсорбция на таком графите $0,02 \text{ см}^3$ раствора каталазы (т. е. такого количества, собственная инактивация которого в адсорбционном слое незначительна) дает катализатор, активность которого равна активности одной каталазы в растворе: активность гемина полностью исчезает (рис. 5). Следовательно, белковые части каталазы и здесь дезактивировали гемин, прикрыв его собою в адсорбционном слое. Простетические группы каталазы на графите, очевидно, обращены в сторону раствора, чем и обуславливается совпадение активности единичной молекулы каталазы в растворе и на носителе. Таким образом, взаимная дезактивация

* В связи с этим следует указать на работу Б. Талмуд и Д. Талмуд, обнаруживших эффект падения активности уреазы на пальмитиновой кислоте (7).

молекул каталазы, происходящая в адсорбционном слое, может быть результатом как взаимодействия геминовых участков друг с другом, так и геминовой группы одной молекулы с белковой частью другой.

Суммируя изложенное, укажем, что понижение активности гемина и каталазы — важнейших компонентов природных каталитических систем — в адсорбционном слое, вследствие ассоциации их молекул, намечает путь к пониманию того важного факта, что биокатализаторы, как правило, действуют при высоких разведениях. Разительным примером этого могут служить ростовые вещества — фитогормоны. Изоляция активных частиц друг от друга

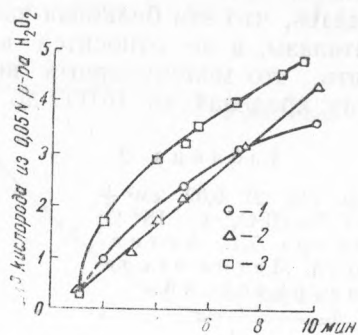


Рис. 4. Инактивация гемина на каталазе. 1 — гемин 2 мг, 2 — каталаза 0,02, см³, 3 — гемин + каталаза, рН = 7,1

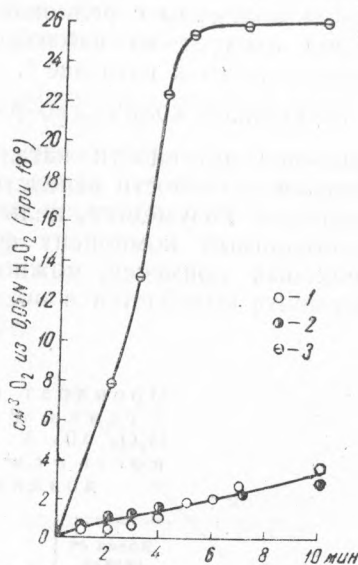


Рис. 5. Уничтожение активности гемина каталазой в адсорбционном слое: 1 — каталаза, 2 — графит + гемин + каталаза, 3 — графит + гемин

является необходимым условием интенсивного действия таких веществ.

Они могут быть названы «автономными структурами», для которых характерно законченное строение активных групп. Эти структуры не нуждаются в комбинировании одинаковых частиц — процессе, который обуславливает каталитическую деятельность частиц (например атомов металла), способных к образованию активных ансамблей.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
16 VII 1946

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. И. Кобозев, ЖФХ, **13**, 1 (1939); **19**, 48 (1945). ² Н. И. Кобозев и Л. Л. Клячко-Гурвич, ЖФХ, **13**, 28 (1939). ³ N. I. Kobosev, Acta Physico-chimica URSS, **9**, 305 (1938). ⁴ Л. А. Николаев и Н. И. Кобозев, ЖФХ, **19**, в. 10 (1945). ⁵ R. Willstätter, Untersuch. über Enzymen, 382, 1928. ⁶ P. Waenity u. O. Steckel, Münch. Med. Wochenschr., **51**, 2083 (1906). ⁷ Б. Талмуд и Д. Талмуд, ЖФХ, **13**, в. 6 (1939).