

М. А. БОКУЧАВА

**НОВЫЙ СПОСОБ ИЗУЧЕНИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ В ПРИСУТСТВИИ
ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗЫ И КАТАЛАЗЫ**

(Представлено академиком А. И. Опариним 27 II 1948)

Обычно в растительных тканях одновременно присутствуют пероксидазы и полифенолоксидазы. Для изучения биологической, а также технологической роли каждого из этих ферментов необходимо их раздельное определение. Существующие методы раздельного и сравнительного определения пероксидазы и полифенолоксидазы не позволяют точно разграничить и учесть действие этих ферментов. Так например, наиболее распространенный колориметрический метод Вильштеттера⁽¹⁾ при определении пероксидазы не учитывает полифенолоксидазную активность исследуемого материала, а метод Кейлина и Манна⁽²⁾ учитывает активность пероксидазы в присутствии полифенолоксидазы по разности показателей между общей активностью пероксидазы и полифенолоксидазы и активностью одной полифенолоксидазы.

Существенным недостатком такого подхода является произвольное допущение, что пероксидаза и полифенолоксидаза образуют одинаковые продукты реакции, что не всегда наблюдается^(3,4). Кроме того, при этом не учитывается, что перекись водорода может инактивировать полифенолоксидазу, что действительно было установлено нами при изучении полифенолоксидазы чайного листа.

Окислительная система фермент + субстрат в присутствии кислорода воздуха обычно дает окрашенные продукты реакции. Добавление к этой системе перекиси водорода иногда не только не увеличивает интенсивности окраски, а даже вызывает ее уменьшение. Этот факт был обнаружен еще в 1922 г. А. Н. Бахом и А. И. Опариним⁽⁵⁾. Такой частный случай мы имеем при ферментации чая. Если моделировать процесс ферментации чая — взять фермент чайного листа и добавить чайный таннин, то за 2—3 часа раствор приобретает коричнево-красный цвет типа чайного настоя. Если к этой системе в начале опыта добавить перекись водорода, то задерживается образование окрашенных продуктов (табл. 1).

Здесь определение активности пероксидазы по разности показате-

Таблица 1

Влияние H_2O_2 на активность полифенолоксидазы чайного листа (активность фермента в % от стандартного раствора)

Система	№№ опытов			
	1	2	3	4
Фермент+субстрат . . .	80	90	95	135
Фермент+субстрат+ H_2O_2	50	60	60	60

телей с перекисью водорода и без нее, как это принято по существующим методам (2), дает отрицательную величину.

В действительности это означает, как выяснилось в предыдущей работе (4), что пероксидаза чайного листа при действии на чайный танин образует бесцветные продукты, поэтому она не может дать увеличение окраски. Уменьшение же происходит в результате инактивирующего влияния перекиси водорода на полифенолоксидазу. Можно было предположить, что уменьшение окраски связано также с действием перекиси водорода на продукты окисления. Однако в специ-

Таблица 2

Влияние NaNO_3 на активность каталазы (0,1 г ацетонового препарата фермента чайного листа + 3 мл воды + 3 мл буферного раствора (рН = 5,3) + 1 мл NaNO_3 + 2 мл 3% H_2O_2 ; температура 20° С)

№№ опытов	Выделившийся кислород в мл за 5 мин.		% ингибирования
	без добавления ингибитора	с добавлением 1 М NaNO_3	
1	8,1	0,2	97,6
2	8,0	0,1	98,8
3	7,9	0,0	100,0

Таблица 3

Влияние NaNO_3 на активность пероксидазы (0,5 г растертой ткани + 3 мл буферного раствора (рН = 5,3) + 4 мл H_2O + 1 мл 1% пирогаллола + 2 мл 1% H_2O_2 ; температура 20°, экспозиция 1 час)

Материал	Активность фермента в % от стандартного раствора	
	без добавления NaNO_3	с добавлением NaNO_3
Хрен	96	95
Лимон (кожура)	40	41
Мандарин (кожура)	33	34
Апельсин (кожура)	42	41
Картофель	57	56
Капуста	5	5

альных опытах, в которых к окрашенным продуктам окисления полифенолоксидазы добавлялась перекись водорода, мы заметили уменьшения окраски не наблюдали.

Может быть, задерживающее действие H_2O_2 на полифенолоксидазу частично связано с конкурирующим действием пероксидазы. Однако, каков бы ни был механизм этого задерживающего действия H_2O_2 на полифенолоксидазу, вопрос о необходимости расчленения деятельности пероксидазы и полифенолоксидазы при изучении их роли в живом организме и раздельного определения их активности не утрачивает своей актуальности.

Все вышеизложенное побудило нас предпринять настоящее исследование с целью выработки нового способа, устраняющего недостатки существующих методов определения пероксидазы. Принцип способа, предложенного нами, заключается в том, что в специальном приборе в вакуумных условиях исключается возможность действия полифенолоксидазы путем удаления кислорода воздуха и ингибирования каталазы.

В качестве ингибитора каталазы мы использовали азотно-кислый натрий, успешно применявшийся в работах А. А. Культюгина и Н. С. Канашенок (6). По данным этих авторов, анионы

NO_3' сильно задерживают действие каталазы и вместе с тем не влияют на активность пероксидазы. Так как исследования указанных авторов были проведены на ферментах крови, явилась необходимость проверить действие NaNO_3 на активность каталазы и пероксидазы растительной ткани. В табл. 2 и 3 представлены результаты проведенных нами в этом направлении опытов.

Как видно из этих данных, 1 М раствор NaNO_3 практически полностью задерживает действие каталазы и не влияет на активность пероксидазы.

Кроме того, опыты на очищенном препарате пероксидазы показали, что вакуум не влияет на активность этого фермента, так как сравнение показателей действия пероксидазы при обычном атмосферном давлении и в вакууме никакого различия не дало.

После соответствующих поисков концентраций и соотношения реагирующих веществ мы остановились на следующем порядке определения пероксидазы.

Исследуемый материал помещают в сухой вакуумный сосудик, туда же добавляют раствор NaNO_3 с тем расчетом, чтобы общая концентрация ингибитора в смеси равнялась молярной, а также добавляют 3 мл буферного раствора ($\text{pH} = 5,3$) + 5 мл воды. В нижний подвижный шарик помещают 1 мл субстрата (1% раствор пирогаллола, пирокатехин и т. п.) и 2 мл 1% перекиси водорода, а в верхний шарик — 3 мл 20% серной кислоты для прекращения реакции в конце опыта.

Заряженный прибор присоединяют к насосу и осторожно, во избежание сильного образования пены, тщательно выкачивают воздух, обычно в течение 2—3 мин., до 8—10 мм Hg. Поворачиванием верхнего шарика, служащего одновременно пробкой, закрывают прибор и разъединяют с насосом. Путем поворачивания бокового шарика в трубку переводят субстрат и перекись водорода. Таким образом, составные компоненты реакционной смеси приходят в контакт, прибор при этом из положения *a* переводится в положение *б* (рис. 1) и ставится при желаемой температуре.

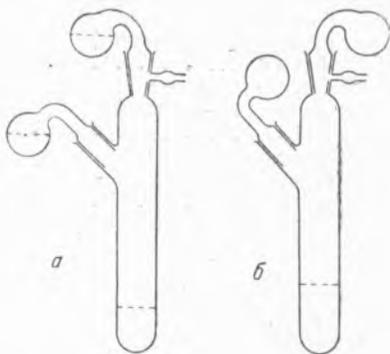


Рис. 1. *a* — положение в начале опыта, *б* — в конце опыта

Таблица 4

Определение пероксидазного действия в вакуумном приборе в присутствии полифенолоксидазы и каталазы

Система	Активность пероксидазы в % от стандартного раствора	
	$\text{pH} = 5,3$	$\text{pH} = 8,0$
Лимон (кожура) + пирогаллол + H_2O_2	40	97
Апельсин + пирогаллол + H_2O_2	45	115
Мандарин + пирогаллол + H_2O_2	34	103
Картофель + пирогаллол + H_2O_2	8	—
Капуста + пирогаллол + H_2O_2	5	—

По окончании опыта действие пероксидазы останавливают добавлением серной кислоты из верхнего шарика. После этого результаты действия пероксидазы, если образуются окрашенные продукты, определяют обычным колориметрическим или фотометрическим методом (7). Если же в результате действия пероксидазы образуются бесцветные продукты, определение ведется титрованием (8). Одновременно ставится контроль в тех же условиях с прокипяченным ферментом. В табл. 4 и 5 приводятся результаты определения пероксидазы в некоторых растительных объектах описанным методом.

Следует отметить, что параллельные определения активности пероксидазы при применении данного способа дают хорошо совпадающие результаты.

Таблица 5

Определение пероксидазного действия в вакуумном приборе путем титрования субстрата

Система	Результаты титрования в мл 0,1 <i>N</i> $KMnO_4$		Активность пероксидазы в мл 0,1 <i>N</i> $KMnO_4$	Цвет опытной смеси
	контроль	опыт		
Фермент чайного листа (ацетоновый препарат) + чайный таннин + H_2O_2	3,8	1,8	2,0	Бесцветный, слегка желтый
Пероксидаза хрена (мязга) + <i>p</i> -крезол + H_2O_2	4,0	2,4	1,6	Молочно-белый
Пероксидаза хрена (мязга) + чайный таннин + H_2O_2	3,8	2,3	1,5	Слегка желтый

Институт биохимии
им. А. Н. Баха
Академии Наук СССР

Поступило
23 II 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. Willstätter Untersuchungen über Enzyme, 1, 1928. ² D. Keilin and T. Mann, Proc. Roy. Soc. B., 121, 187 (1938). ³ J. Summer and G. Somers, Chemistry and Methods of Enzymes, 1945. ⁴ М. А. Бокучава, Биохимия, 13, в. 2 (1948). ⁵ А. Н. Бах и А. И. Опарин, Сб. избранных трудов А. Н. Баха, 1937, стр. 431. ⁶ А. А. Культюгин и Н. С. Канашенок, Биохимия, 4, в. 2, 133 (1939). ⁷ С. М. Прокошев, Биохимия, 9, в. 1, 36 (1944). ⁸ М. А. Бокучава, Т. А. Шуберт и В. Р. Попов, Биохимия, 13, в. 1 (1948).