

Д. М. МИХЛИН и З. С. БРОНОВИЦКАЯ

## О СВЯЗИ МЕЖДУ ЦИТОХРОМ-С-ПЕРОКСИДАЗОЙ И ДРУГИМИ ОКИСЛИТЕЛЬНЫМИ СИСТЕМАМИ

(Представлено академиком А. И. Опариным 22 IV 1948)

В своей работе по изучению дыхательных ферментов растительного организма Д. М. Михлин и П. А. Колесников<sup>(1)</sup> обратили внимание на то, что биологическая функция пероксидазы, окисляющей фенолы, зависит, вероятно, от деятельности других ферментов, дающих в качестве побочного продукта перекись водорода или образующих органические перекиси. Д. М. Михлин и К. В. Пшенова<sup>(2)</sup> показали, что перекиси ненасыщенных жирных кислот могут служить источником активного кислорода при пероксидазном окислении полифенолов. В настоящей работе мы попытались изучить взаимоотношение другой пероксидазы, а именно цитохром-С-пероксидазы, с другими окислительными ферментами и таким путем получить некоторые данные о биологической роли этой пероксидазы. Цитохром-С-пероксидаза была открыта Альтшулем и Хогнессом<sup>(3)</sup> в хлебных дрожжах больше 5 лет тому назад. С тех пор, насколько нам известно, не появилось ни одной работы по цитохром-пероксидазе.

Названные исследователи пользовались спектрофотометрическим методом. Мы применили метод простой спектроскопии и обнаружили цитохром-С-пероксидазу в продажных хлебных дрожжах, пользуясь спектрометром Цейсса с дифракционной решеткой.

Принцип метода заключается в том, что цитохром-С-пероксидаза в присутствии перекиси окисляет предварительно восстановленный цитохром С. Это узнается по исчезновению спектральных адсорбционных линий 550 и 520  $\mu$ , характерных для восстановленного цитохрома С.

Изолирование фермента производилось по методу Альтшуля и Хогнесса, с небольшими изменениями. Продажные хлебные дрожжи трижды промываются дистиллированной водой и отсасываются на воронке Бюхнера до полного уплотнения. Затем дрожжи растираются с водой, насыщенной толуолом. Вода прибавляется из расчета 3 л дистиллированной воды на 1 кг сухих дрожжей. Суспензия аутолизуется при 25°C в течение 24—72 час., охлаждается и отсасывается на воронке Бюхнера. На каждый литр мутноватого аутолиза вносится 350 г сернокислого аммония и 55 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты. Температура 0°. Выпадающий осадок отфильтровывается на воронке Бюхнера. Фильтрат отбрасывается; осадок дважды экстрагируется дистиллированной водой. рН объединенных экстрактов доводится до 3,8, и раствор диализуется 15—20 час. в холодной проточной дистиллированной воде. После центрифугирования диализата получается чистый, прозрачный раствор, содержащий фермент.

В опыт брался раствор 0,05 мг цитохрома С в 2 мл воды. Цитохром получен по методу Кейлина и Хэрти<sup>(4)</sup>. Восстановление его производилось или 0,005 мг аскорбиновой кислоты в 0,1 мл воды,

или 0,03 мг гидрохинона в том же объеме воды. Восстановление цитохрома заканчивается через 10 мин. Затем прибавляется 0,25 мл раствора цитохром-С-пероксидазы и 0,0025 мг перекиси водорода в 1 мл воды. Через 1—2 мин. происходит исчезновение спектральных линий, характерных для восстановленного цитохрома С.

Таблица 1  
Скорость окисления цитохрома  
(Цитохром С 0,05 мг, перекись водорода 0,0025 мг, гидрохинон 0,03 мг, вода 3,1 мл)

Раствор цитохром-С-пероксидазы в мл	Скорость окисления цитохрома в сек.
0,2	30
0,1	110
0,05	360
0,025	960

Прибавление одного раствора фермента или одной перекиси не вызывает окисления цитохрома в продолжение нескольких часов. В табл. 1 показана зависимость скорости окисления цитохрома от количества прибавленного фермента.

Нельзя было установить пропорциональность между количеством фермента и скоростью окисления цитохрома. Однако наблюдается определенная корреляция между ними.

При применении аскорбиновой кислоты часто наблюдается обратное восстановление окисленного цитохрома через 10—15 мин. избытком восстановителя. Это обратное восстановление не имеет места при прибавлении к окисленному цитохрому 0,01 мг сернокислой меди, окисляющей избыток аскорбиновой кислоты. Гидрохинон не дает такого обратного восстановления. Повторное восстановление может быть вызвано лишь прибавлением новой порции гидрохинона, а именно:

- 0,05 мг цитохрома, 0,03 мг гидрохинона,  
2 мл воды . . . . . восстановление  
+ 0,025 мг перекиси водорода и 0,25 мл раствора  
цитохром-С-пероксидазы . . . . . окисление
- Добавлено 0,09 мг гидрохинона . . . . . восстановление  
+ 0,025 мг перекиси водорода и 0,25 мл раствора  
цитохром-С-пероксидазы . . . . . окисление

Это обратимое окисление — восстановление было повторено 5 раз. Биологическая роль цитохром-С-пероксидазы определяется тем, что ее непосредственным субстратом окисления является широко распространенный в живой природе цитохром С, служащий промежуточным катализатором при окислении продуктов распада белков, жиров и углеводов.

Окисление в наших опытах гидрохинона и аскорбиновой кислоты указывает на возможность биологической функции цитохром-С-пероксидазы в тех случаях, когда участвуют эти промежуточные катализаторы окисления.

Но действие всякой пероксидазы связано с наличием перекиси водорода или органических перекисей. Нами было найдено, что при замене перекиси водорода 0,002 M раствором диэтилпероксида, полученного по методу Рихе (5), окисление взятого в опыт цитохрома заканчивается через 2—3 мин.

Другой органической перекисью, взаимодействующей с цитохром-С-пероксидазой, оказался гидропероксид, образующийся при действии липооксидазы на линолевую кислоту.

Опыт с липооксидазой. Раствор липооксидазы приготавливался по Д. М. Михлину и К. В. Пшеновой (2). Через смесь из 10 мл раствора липооксидазы и 0,4 г линолевой кислоты продувается воздух в течение 60 мин. Затем смесь переносится в коллодийную гильзу и диализуется в 5 мл дистиллированной воды. Диализат содержит перекиси, которые обнаруживаются реакцией с иодистым калием. 1 мл

такого диализата с 0,25 мл раствора цитохром-С-пероксидазы вызывает окисление предварительно восстановленного цитохрома С через 45 сек.

Источниками перекиси водорода нам служили следующие оксидазные (или аэродегидразные) системы: оксидаза *d*-аминокислот, выделенная из почки собаки (1), ксантинооксидаза (2), глюкооксидаза из культуры *Penicillium notatum* (3), в присутствии соответствующих субстратов. При замене перекиси водорода какой-нибудь из этих окислительных систем происходит окисление предварительно восстановленного цитохрома С со скоростью, не превышающей 10 мин. Как известно, перекись водорода является вторичным продуктом действия названных ферментов. Однако окисление восстановленного цитохрома получается только в отсутствие буферов или других солей, которые задерживают действие цитохром-С-пероксидазы.

При работе с суспензиями или мутным раствором оксидаза (например оксидаза аминокислот или липооксидаза) со своим субстратом помещается в коллодиевую гильзу, через стенки которой образующаяся перекись диффундирует в раствор восстановленного цитохрома.

Приводим один из таких опытов. Из 700 мл жидкости, в которой выращивался плесневый гриб *Penicillium notatum*, путем осаждения спиртом, насыщенным бензойной кислотой, с последующим переосаждением ацетоном были выделены 0,2 г сухого осадка, который экстрагировался 10 мл дистиллированной воды. Это раствор глюкооксидазы.

Получение перекиси. Смесь из 3 мл 1% раствора глюкозы и 5 мл раствора глюкооксидазы помещается в коллодиевую гильзу и диализуется в 5 мл дистиллированной воды в течение 45 мин. Реакция на перекись с иодистым калием положительная.

В опыте: 3 мл воды, 0,05 мг цитохрома С, 0,03 мг гидрохинона. При прибавлении 0,25 мл раствора цитохрома-С-пероксидазы и 1 мл диализата (содержащего перекись) спектр восстановленного цитохрома исчезает через 60 сек. В контроле спектр сохраняется по крайней мере 1 час.

Аналогичным образом были использованы в качестве источника перекиси водорода *d,l*-аланин с оксидазой  $\alpha$ -аминокислот. Окисление восстановленного цитохрома произошло через 5 мин. С очищенным по Збарскому и Михлину (4) энзимом Шардингера в присутствии гипоксантина или уксусного альдегида исчезновение спектра восстановленного цитохрома получилось через 5 и 10 мин., соответственно. В контрольных пробах спектр сохранялся более часа.

Мы, таким образом, могли подтвердить, что в хлебных дрожжах найдена цитохром-С-пероксидаза, окисляющая в присутствии цитохрома С гидрохинон и аскорбиновую кислоту, которые сами являются промежуточными катализаторами окисления. Этот фермент может быть обнаружен методом спектроскопии.

Функция цитохром-С-пероксидазы может быть связана с функциями оксидазы  $\alpha$ -аминокислот, ксантин- и альдегидоксидазы, глюкооксидазы и липооксидазы, а также других ферментов, при действии которых образуется перекись водорода или органическая перекись.

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

Поступило  
22 IV 1948

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 Д. М. Михлин и П. А. Колесников, Биохимия, 12, № 5 (1947). 2 Д. М. Михлин и К. В. Пшенова, Биохимия, 11, № 5 (1946). 3 А. М. Altschul and T. K. Hogness, J. Biol. Chem., 136, 777; 142, 303 (1942). 4 D. A. Keilin and E. F. Hartree, Biochem. J., 32, 289 (1945). 5 A. Rieche, Chem. Ber., 62, 218 (1929). 6 O. U. Warburg u. H. W. Christian, Biochem. Z., 298, 150 (1938). 7 В. Sbarsky u. D. Michlin, ibid., 155, 485; 164, 442 (1925). 8 E. C. Kober's and co-workers, J. Biol. Chem., 147, 47 (1943).