Доклады Академии наук СССР
1955. Том 101, № 2

БИОХИМИЯ

Д. М. МИХЛИН и К. В. ПШЕНОВА

О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ОКСИДАЗНЫХ СИСТЕМ

(Представлено академиком А. И. Опариным 4 XII 1954)

Известно, что ферментативная активность полифенолоксидазы, особенно очищенной, быстро убывает в процессе действия фермента. Инактивирование начинается в первые минуты реакции. Возможно даже, что кажущееся иногда отсутствие этого фермента в том или другом биологическом материале объясняется его полным инактивированием в первые минуты опыта.

Такое быстрое инактивирование полифенолоксидазы в процессе ферментативного катализа нельзя объяснить иначе, как взаимодействием промежуточных или конечных продуктов реакции с белковой частью фермента. Хотя механизм действия полифенолоксидазы еще не изучен, но на основании некоторых экспериментальных данных, главным образом кинетического характера, предполагается образование таких очень реакционноспособных промежуточных продуктов, как оксихиноны, триоксибензол и др. Ортохинон, который предполагается в качестве конечного продукта ферментативного действия полифенолоксидазы, тоже оказывается в растворе крайне неустойчивым химическим соединением, быстро переходящим в другие, еще мало изученные продукты.

Взаимодействие упомянутых и других возможных промежуточных или конечных продуктов ферментативного окисления пирокатехина и его производных с белком полифенолоксидазы очень вероятно. Были получены ([1]) экспериментальные доказательства реакции хиноидных соединений с различными аминокислотами.

Если продукты окисления пирокатехина и его производных действуют на белковый компонент полифенолоксидазы, то естественно ожидать влияния этих продуктов и на другие ферменты. Много исследований было посвящено действию различных хиноидных соединений на окислительные ферменты, в том числе на цитохромоксидазу животного происхождения, но ясности в этом вопросе еще нет. С одной стороны, были указания, что хиноны не влияют на активность цитохромоксидазы ([4, 5]). Но в последнее время были получены результаты, указывающие на значительное инактивирование цитохромоксидазы различными хиноидными соединениями ([6]). Это инактивирование обычно связывают с блокированием сульфгидрильных групп, которые, по одним утверждениям, имеют значение для активности цитохромоксидазы, по другим — не имеют. Мы испытали влияние на растительную цитохромоксидазу 10^{-4} *М* раствора *п*-хлормеркурибензоата, который считается одним из самых чувствительных реагентов на сульфгидрильные группы.

Раствор такой концентрации почти полностью снимает действие сукциндегидрогеназы. Цитохромоксидаза была получена по методу Годдарда ([7]) из 3-дневных проростков ячменя, богатых, как показали Д. М. Михлин и П. А. Колесников, цитохромоксидазой ([3]). Цитохром «с» был получен из коровьих сердец по методу Кейлина ([8]). Субстратом служил гидрохинон. Одновременно было испытано также действие *п*-хлор-

меркурибензоата на глюкозооксидазу, полученную из Aspergillus niger ([9]). Опыты проводились на аппарате Варбурга при температуре 25°. Объем реакционной смеси 5,3 мл. Буфер фосфатный, pH 6,8.

Таблица 1

Влияние *п*-хлормеркурибензоата на активность растительной цитохромоксидазы и плесневой глюкозооксидазы

Состав смеси	Поглощено O_2 в µл		
	оп. № 1 60 мин.	оп. № 2 120 мин.	оп. № 3 120 мин.
1 мл цитохромоксидазы + + 0,5 мл цитохрома „с" + + 4 мг гидрохинона . . .	33,0	61,3	73,0
То же, но с *п* хлормеркурибензоатом	27,6	55,6	63,0
1 мл раствора глюкозооксидазы (2 мг) + 5 мг глюкозы	220,3	223,0	
То же, но с *п*-хлормеркурибензоатом	218,4	227,0	

Как видно из данных табл. 1, *п*-хлормеркурибензоат не влияет на активность растительной цитохромоксидазы и плесневой глюкозооксидазы. Следовательно, сульфгидрильные группы не имеют значения для действия этих ферментов.

Таблица 2

Взаимодействие полифенолоксидазной и цитохромоксидазной систем

Цитохромная система: 2 мл суспензии (2 : 10) из проростков ячменя на фосфатном буфере pH 6,8, или 1 мл выделенной цитохромоксидазы + 0,5 мл цитохрома «с» и 0,5 мл раствора гидрохинона (4 мг). Общий объем реакционной смеси 5,3 мл.

Полифенолоксидазная система: 5 мг или 2,5 мг чистого препарата полифенилоксидазы в 1 мл воды + 2 мг пирокатехина + 4 мг гидрохинона + + 2 мл фосфатного буфера pH 6,8. Общий объем реакционной смеси 5,3 мл. Полифенолоксидаза была получена из картофельных клубней.

	Поглощено O_2 в µл за 60 мин.		
	оп. № 1	оп. № 2	оп. № 3
Цитохромная система (не изолированная цитохромоксидаза)	81,0	156,1	145,1
Полифенолазная система . . .	523,2	452,5	283,7
Обе системы вместе	570,0	493,7	345,5
Уменьшение в % против суммы	5,7	19,0	19,5
Цитохромная система (изолированная цитохромоксидаза).	43,5	41,4	
Полифенолазная система . . .	310,4	284,1	
Обе системы вместе	187,0	170,0	
Уменьшение в % против суммы	47,2	47,8	

Изолированные ортохиноны в качестве ингибиторов ферментов, насколько нам известно, никогда не применялись вследствие, вероятно, крайней их лабильности в растворе. Еще менее устойчивы промежуточные продукты окисления ортофенолов. Обойти эти трудности мы попытались

путем изучения влияния этих соединений в момент их образования, без изолирования. Для этого, как видно из табл. 2, мы комбинировали полифенолоксидазную систему с цитохромной и с глюкозооксидазной.

В смеси полифенолоксидазной и цитохромной систем наблюдается значительно меньшее поглощение кислорода, чем можно было ожидать из активности каждой из этих систем в отдельности. Такое уменьшение можно объяснить частичным инактивированием одной системы продуктами окисления другой.

Прежде всего приходится думать о действии продуктов окисления пирокатехина (промежуточных или конечных) на цитохромоксидазу. Но, как видно из табл. 2, в смеси оксидазных систем произошло значительное уменьшение активности полифенолоксидазы. Здесь поглощено всего 187 µл кислорода вместо 310 µл в одной только полифенолоксидазной

Таблица 3

Влияние одного пирокатехина на цитохромную систему

В качестве цитохромоксидазы употреблялась суспензия из проростков кориандра в концентрации 2 : 10 на фосфатном буфере pH 6,8.

Состав смеси	Поглощено O_2 в µл за 60 мин.	
2 мл суспензии + 0,5 мл цитохрома „c" + + 2 мг гидрохинона	111,7	46,2
То же + 2 мг пирокатехина	153,2	54,6
Кипяченая суспензия + цитохром „c" + + гидрохинон + пирокатехин	14,5	—

системе. Падение активности полифенолоксидазы в присутствии цитохромоксидазной системы можно объяснить окислением гидрохинона, который в полифенолазной системе оказывает защитное действие на фермент. Произошло распределение гидрохинона между обоими ферментами. Но возможны и другие взаимодействия.

Таблица 4

Состав смеси	Поглощено O_2 в µл за 60 мин.
1 мл раствора глюкозооксидазы (1 мг) + 5 мг глюкозы	113,5
1 мл раствора полифенолоксидазы (2,5 мг) + 2 мг пирокатехина . .	37,3
Обе системы вместе	110,5
Уменьшение в % против суммы . .	26,8

Во всяком случае при одновременном действии полифенолоксидазной системы с цитохромной значительно уменьшается (до 47%) поглощение кислорода по сравнению с тем, которого можно было ожидать на основании активности каждой из этих систем в отдельности. Один пирокатехин, без полифенолоксидазы, не оказывает инактивирующего влияния на цитохромоксидазу. Происходит лишь небольшое его окисление цитохромной системой, как и можно было ожидать.

Взаимодействие полифенолоксидазной системы с глюкозооксидазной системой. Глюкозооксидаза, как известно, принадлежит к группе флавопротеиновых ферментов, не содержащих тяжелых металлов, и также частично осуществляет дыхание растений и животных. Казалось интересным изучить влияние полифенолазной системы и на глюкозооксидазную систему. Для этой цели глюкозооксидаза выделялась из Aspergillus niger, как было указано выше. Результаты опытов приведены в табл. 4.

В этом случае поглощение кислорода уменьшилось. Но такое уменьшение наблюдалось не со всеми препаратами полифенолоксидазы. Контрольные опыты показали, что пирокатехин, прибавленный к глюкозо-

оксидазной системе, и глюкоза, прибавленная к полифенолоксидазной системе, не оказывают влияния на поглощение кислорода.

Так как недостаточно очищенная цитохромоксидаза из ячменных проростков содержит свободную или связанную глюкозу, то необходимо было поставить контроль из смеси глюкозооксидазы без глюкозы и цитохромоксидазы. Эти контрольные смеси давали значительное поглощение кислорода (170 или 190 µл за 1 час), на которое следует уменьшить общее количество кислорода, поглощенное смесью двух полных оксидазных систем.

Таблица 5

Взаимодействие цитохромной и глюкозооксидазной систем

Общий объем реакционной смеси 5,3, мл. Буфер фосфатный pH 6,8, температура 25°.

Состав смеси	Поглощено O_2 в µл за 60 мин.		
	оп. № 1	оп. № 2	оп. № 3
1 мл раствора глюкозооксидазы (1 мг)+ +5 мг глюкозы	120,0	119,4	76,4
1,5 мл раствора очищенной цитохромоксидазы + 0,5 мл цитохрома „c" + + 4 мг гидрохинона	37,2	47,0	35,5
Обе системы вместе	70,0	99,0	11,0
Уменьшение в % против суммы	55,5	40,6	90,2

Как видно, в смеси цитохромной и глюкозооксидазной систем произошло значительное уменьшение поглощения кислорода.

Так как нет оснований ожидать инактивирующего действия со стороны глюконовой кислоты, которая является продуктом действия глюкозооксидазы, то, вероятно, продукты окисления гидрохинона влияют каким-то образом на глюкозооксидазную систему. Известно инактивирующее действие хинонов на оксидазу *d*-аминокислот, представляющую собой, как и глюкозооксидаза, флавопротеин.

Выводы

1. При изучении совместного действия полифенолоксидазной и цитохромной систем показано инактивирующее влияние одной системы на другую. Это инактивирующее влияние проявляется в 2—3 раза сильнее с выделенной растительной цитохромоксидазой, чем с суспензией из проростков ячменя, содержащих цитохромоксидазу.

2. Сам цитохром «с», прибавленный к полифенолоксидазной системе, не оказывает никакого действия на поглощение кислорода. Прибавление пирокатехина к цитохромной системе дает небольшое увеличение поглощения кислорода.

3. Полифенолоксидазная система оказывает инактивирующее влияние и на глюкозооксидазную систему.

4. Инактивирование цитохромоксидазы и глюкозооксидазы продуктами окисления полифенолов не связано с окислением сульфгидрильных групп.

5. Физиологическое значение взаимодействия разных оксидазных систем трудно учесть, но с таким взаимодействием необходимо считаться при попытках экспериментальным путем определить удельное значение какой-либо отдельной оксидазы.

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

Поступило
2 XII 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] W. O. James et al, Biochem. J., **43**, 626 (1948). [2] Д. М. Михлин, К. В. Пшенова, Биохимия, **16**, № 1 (1951). [3] Д. М. Михлин, П. А. Колесников, Биохимия, **12**, № 5, (1947). [4] E. G. Ball et al, J. Biol. Chem., **168**, 257 (1947). [5] R. M. Hochster, Nature, **164**, No. 4177, 865 (1949). [6] A. Herz, Biochem. Zs., **325**, H. 2, 83 (1954). [7] D. R. Goddard, Am. J. of Bot., **31**, No. 5, 270 (1944). [8] D. Keilin, E. F. Hartree, Biochem. J., **39**, 289 (1945). [9] R. L. Blakley, ibid., **49**, No. 3, 257 (1951).