

ПОХІДНІ КУМАРИНУ ЯК СУБСТРАТИ ЛАККАЗИ *TRAMETES VERSICOLOR*Бураков І. М.¹, Лесишина Ю. О.¹, Цяпало О. С.¹, Фрасинюк М. С.², Шендрик О. М.¹¹Донецький національний університет імені Василя Стуса²Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України

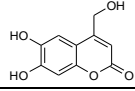
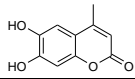
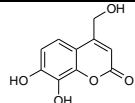
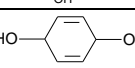
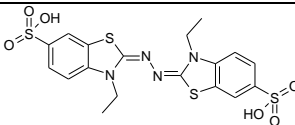
burakov.i@donnu.edu.ua

Лаккази каталізують окиснення великого переліку субстратів, які можна поділити на дві групи: донори електронів і протонів (феноли та аміни) та донори електронів (фероціаніди, 2,2'-азинобіс(3-етилбензтіазолін-6-сульфонової кислоти) діамонієва сіль (АБТС)). Типовими субстратами лакказ різного походження є гідрохінон (ГХ), сиригальдазин, АБТС тощо, які найбільш ефективно окиснюються молекулярним киснем в присутності ферменту, а кінетичні параметри реакції характеризуються низьким значенням константи Міхаеліса (K_m) і високим числом обертів ферменту (k_{cat}).

У даній роботі визначено субстратну специфічність ферментного препарату «Laccase from *Trametes versicolor*» (фірми «Sigma», Німеччина) по відношенню до вперше синтезованих похідних кумарину: 7,8-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарину; 6,7-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарину та 6,7-дигідрокси-4-метилкумарину як потенційних сполук з антиоксидантними та/або медіаторними властивостями.

Кінетику реакцій ферментативного окиснення похідних кумарину, ГХ та АБТС молекулярним киснем досліджували методом UV-VIS-спектрофотометрії. Реакцію проводили в цитратному буферному розчині з рН – 4,5; розчини субстрату і ферменту змішували безпосередньо в кюветі спектрофотометру; концентрації субстрату в реакційній суміші в початковий момент часу змінювали в інтервалі 10^{-5} – 10^{-4} М; концентрація лаккази була постійною і становила 60 мг/л; тиск атмосферний; температура – 35 °С. Початкову швидкість реакції окиснення субстратів визначали як тангенс кута нахилу початкової прямолінійної ділянки кінетичної кривої; максимальну швидкість (V_{max}) та константу Міхаеліса (K_m) розраховували, виходячи з рівняння Міхаеліса-Ментен, лінеаризованого у подвійних обернених координатах Лайнуївера-Берка. Результати дослідження представлені в таблиці.

Таблиця

Субстрат	Структурна формула	V_{max} , мкМ·с ⁻¹	K_m , мМ
6,7-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарин		0,08	428
6,7-дигідрокси-4-метилкумарин		0,19	558
7,8-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарин		0,28	223
гідрохінон		0,83	394
АБТС		1,37	86

З даних таблиці видно, що всі досліджувані кумарини ефективно окиснюються у присутності лаккази; швидкість реакції залежить від структури кумарину і є меншою у порівнянні з типовим субстратом лаккази – гідрохіноном; найбільшу спорідненість та каталітичну активність ферментний препарат проявляє до 7,8-дигідрокси-4-гідроксиметилкумарину.