

УДК 577.15

*Е. Ю. КОХАНОВСКАЯ, И. В. СЕМАК***КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ ЛАКТОПЕРОКСИДАЗЫ
СЫВОРОТКИ МОЛОКА КОЗЫ***Белорусский государственный университет, Минск, e-mail: semak@bsu.by**(Поступила в редакцию 18.12.2014)*

Введение. Одним из ферментов, обнаруженных в молоке, слюне и других биологических жидкостях, является лактопероксидаза (1.11.1.7, ЛПО) [1–3]. В реакции окисления пероксидом водорода ЛПО в качестве доноров электронов использует галогенид- или псевдогалогенид-ионы [4–7], при этом образуются несколько промежуточных соединений [8, 9]. Продукты реакции естественных субстратов с ЛПО обладают бактерицидным и фунгицидным действием [10, 11], что может найти применение в медицине, ветеринарии, защите растений, пищевой и косметической промышленности [12].

Использование современных технологий при производстве козьего молока позволяет получать ЛПО в промышленных масштабах, однако кинетические характеристики ЛПО молока козы изучены недостаточно.

Цель исследования – определение кинетических параметров окисления естественных субстратов ЛПО сыворотки молока козы.

Материалы и методы исследования. ЛПО сыворотки молока козы была получена методом катионообменной хроматографии. Начальную скорость окисления естественных субстратов определяли в области линейной зависимости изменения оптической плотности от времени, варьируя pH раствора (3,8–8,0), концентрацию ЛПО сыворотки молока козы (0,5–40,0 нг/мл), концентрацию субстратов (25–600 мкМ). Во всех случаях реакционная смесь содержала 0,2 мМ H_2O_2 [7]. Скорость окисления субстратов фиксировали по изменению оптической плотности раствора (412 нм при окислении тиоцианат- и бромид-ионов, 353 нм при окислении иодид-ионов) в течение 20 с после добавления H_2O_2 [5, 13].

Зависимость начальной скорости реакции от концентрации фермента и концентрации субстратов проводили при оптимуме pH. Кинетические параметры определяли методом Лайнуивера–Берка и Эдди–Хофсти [14], пероксидазную активность – спектрофотометрически на спектрофотометре Solar PV 1251.

Результаты и их обсуждение. Была исследована зависимость скорости окисления SCN^- , Vg^- и I^- от концентрации ЛПО сыворотки молока козы (0,5–40,0 нг/мл). Скорость окисления SCN^- при использовании ЛПО молока козы в концентрации 5–15 нг/мл увеличивается прямо пропорционально концентрации фермента, но при ее концентрации более 15 нг/мл подобной зависимости не наблюдается (рис. 1), так как продукты реакции ЛПО с естественными субстратами являются окислителями [12], а при увеличении концентрации фермента достигается высокая начальная скорость реакции, ЛПО повреждается окисленными субстратами и скорость ферментативной реакции снижается. Кроме того, использующиеся для визуализации реакции хромогенные детекторы псевдогалогенидов могут снижать пероксидазную активность посредством прямого связывания с ферментом или путем формирования супероксидов [13].

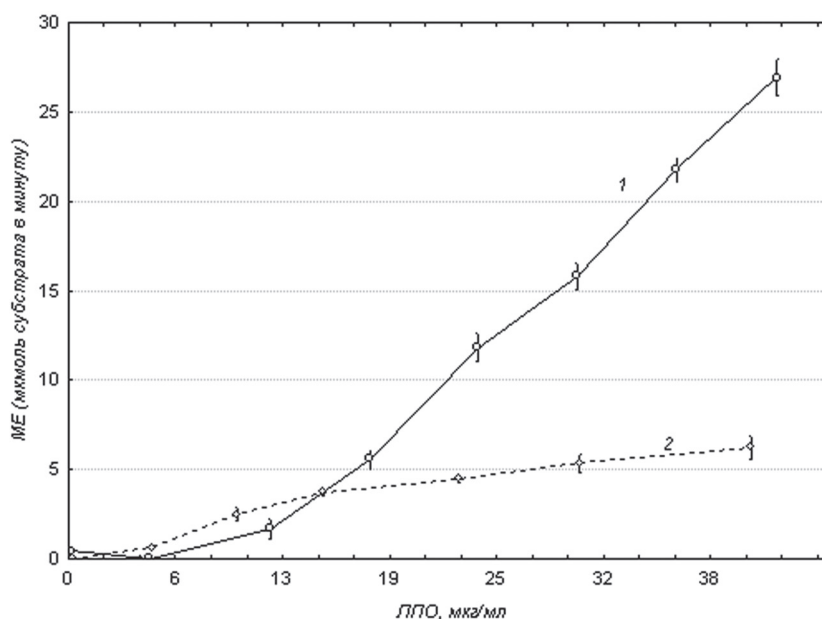


Рис. 1. График зависимости скорости окисления I^- (1) и SCN^- (2) от концентрации ЛПО молока козы

Окисление I^- фиксировалось по формированию иод-иодидного комплекса. При окислении I^- с помощью ЛПО молока козы в концентрации 12–40 нг/мл наблюдалась прямая зависимость скорости реакции от концентрации фермента, а при концентрации ЛПО ниже 12 нг/мл скорость окисления субстрата была меньше ожидаемой (рис. 1). Это могло быть следствием присутствия в реакционной среде ингибиторов, влияние которых заметно при малых концентрациях фермента. При окислении Br^- с помощью ЛПО молока козы в концентрации 0,5–4,0 нг/мл было зафиксировано пропорциональное увеличение скорости окисления данного иона (рис. 2).

При определении оптимального значения pH для естественных субстратов было установлено, что для SCN^- и Br^- оптимум pH находится в диапазоне от 4,3 до 5,6 (рис. 3). Оптимальный диапазон pH для работы ЛПО в реакции окисления I^- более широкий – от 4,0 до 6,2 (рис. 3). Это согласуется с результатами других авторов (сходный оптимум pH при окислении естественных

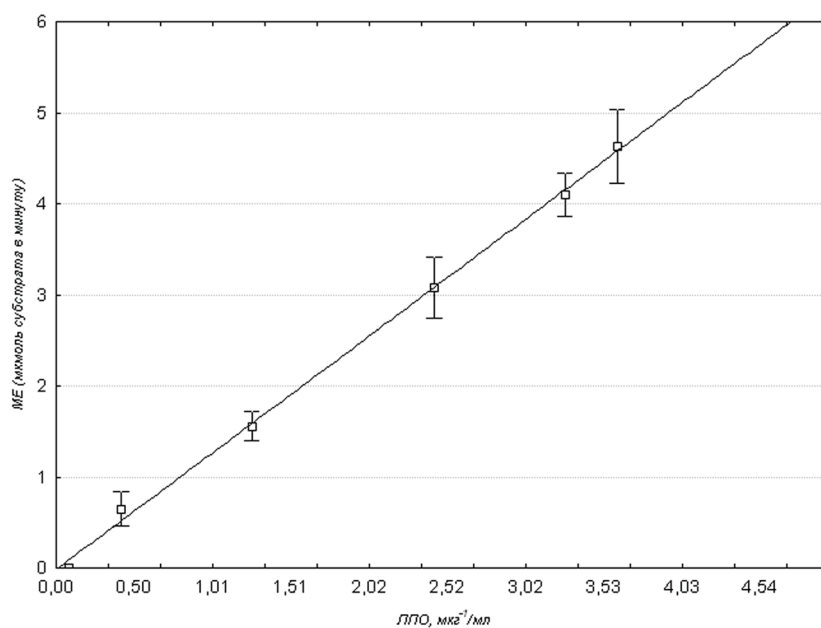


Рис. 2. График зависимости скорости окисления Br^- от концентрации ЛПО молока козы

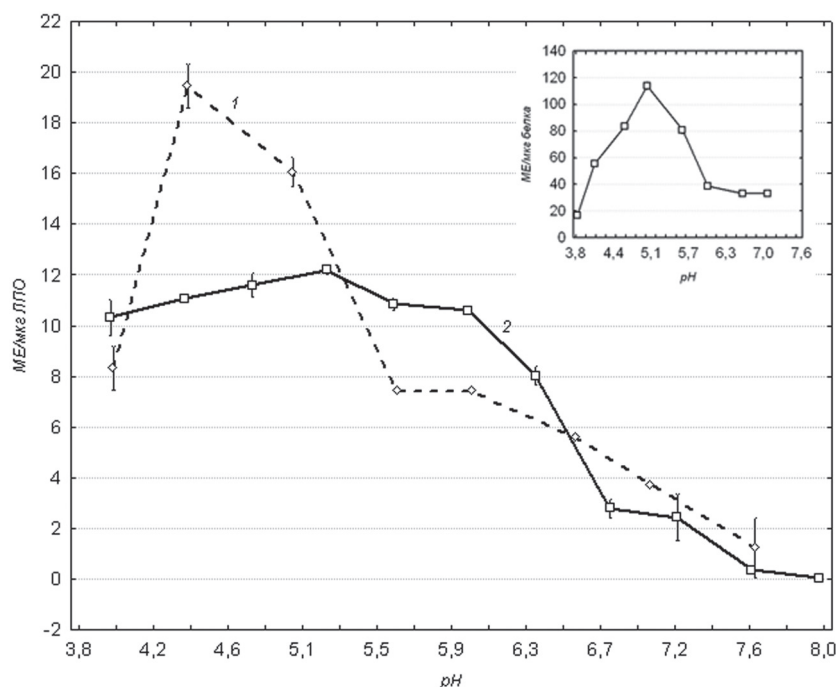


Рис. 3. График зависимости скорости окисления естественных субстратов ЛПО молока козы от pH: 1 – бромид, 2 – иодид, на врезке – тиоцианат

субстратов наблюдается для пероксидазы слюнных желез овец: $\text{Br}^- - 5,0$, $\text{SCN}^- - 5,25$, $\text{I}^- - 5,5$). При физиологических значениях pH SCN^- является основным субстратом для генерации биологически активных соединений, так как его концентрация во внеклеточной жидкости значительно выше, чем других естественных субстратов [6].

Наряду с pH-оптимумом одним из основных параметров кинетической характеристики фермента является константа Михаэлиса (K_M). Кинетические параметры ЛПО сыворотки молока козы были определены по влиянию концентрации субстрата на формирование окисленных продуктов реакции (табл. 1, 2) [6, 13].

Таблица 1. Значения константы Михаэлиса для пероксидаз различного происхождения при окислении SCN^- , Br^- и I^-

Фермент	SCN^- , мМ	Br^- , мМ	I^- , мМ	Источник
Лактопероксидаза молока козы	0,084	2,1	0,75	Наст. иссл.
Рекомбинантная эозинофильная пероксидаза человека	0,076	1,3	–	13
Эозинофильная пероксидаза свиньи	0,43	0,9	–	13
Пероксидаза слюнных желез овец	1,4	1,8	0,66	6

Таблица 2. Кинетические параметры пероксидаз различного происхождения при окислении SCN^- , Br^- и I^-

Фермент	$K_{кат} \text{ c}^{-1}$			$K_{кат}/K_M \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$			Источник
	SCN^-	I^-	Br^-	SCN^-	I^-	Br^-	
Лактопероксидаза молока козы	12,5	1,78	0,72	$1,5 \cdot 10^5$	$2,4 \cdot 10^3$	$3,8 \cdot 10^2$	Наст. иссл.
Рекомбинантная эозинофильная пероксидаза человека	13,6	–	0,46	$1,8 \cdot 10^5$	–	$3 \cdot 10^2$	13
Эозинофильная пероксидаза свиньи	15,4	–	3,6	$1,1 \cdot 10^4$	–	$4 \cdot 10^3$	13

K_M для ЛПО молока козы при окислении SCN^- составляет 0,084 мМ, что сходно со значением K_M для этого же субстрата при окислении его рекомбинантной эозинофильной пероксидазой человека [13]. Окисление данного субстрата другими пероксидазами менее эффективно. Так, на-

пример, при окислении SCN^- для эозинофильной пероксидазы свиньи K_M составляет 1,4 мМ [14], а для пероксидазы слюнных желез овец – 0,43 мМ [6]. K_M лактопероксидазы молока козы при окислении Br^- составляет 2,1 мМ, что наиболее близко к значению K_M при окислении Br^- пероксидазой слюнных желез овец – 1,8 мМ [6]. Кроме того, сопоставимые с пероксидазой слюнных желез овец значения K_M для ЛПО молока козы были получены и при окислении другого субстрата – Γ (0,75 мМ для ЛПО молока козы и 0,66 мМ для пероксидазы слюнных желез овец) [6]. Это можно объяснить сходной первичной структурой данных ферментов, так как известно, что пероксидаза слюнных желез млекопитающих является продуктом того же гена, который отвечает за синтез ЛПО в молочных железах [12].

Таким образом, при сравнении ЛПО молока козы по значению K_M при окислении естественных субстратов с другими пероксидазами животных были установлены сходные кинетические параметры для ЛПО молока козы и рекомбинантной эозинофильной пероксидазы человека при окислении SCN^- и для ЛПО молока козы и пероксидазы слюнных желез овец при окислении Br^- и Γ .

По значению каталитической константы ($K_{\text{кат}}$) можно судить об эффективности превращения субстрата в активном центре фермента и об образовании продукта в оптимальных условиях.

ЛПО молока козы и эозинофильные пероксидазы человека и свиньи с одинаковой эффективностью окисляют SCN^- , на что указывают сопоставимые значения $K_{\text{кат}}$ для данных ферментов ($12,5 \text{ с}^{-1}$ для ЛПО, $13,6 \text{ с}^{-1}$ для рекомбинантной эозинофильной пероксидазы человека и $15,4 \text{ с}^{-1}$ для эозинофильной пероксидазы свиньи) [13]. В отношении Br^- ЛПО молока козы более эффективна, чем эозинофильная пероксидаза человека, так как $K_{\text{кат}}$ ЛПО при окислении данного субстрата выше ($0,72 \text{ с}^{-1}$ для ЛПО и $0,46 \text{ с}^{-1}$ для рекомбинантной эозинофильной пероксидазы человека) [13].

Параметр $K_{\text{кат}}/K_M$ связывает скорость реакции с концентрацией свободного фермента и представляет собой коэффициент, который показывает продуктивность этого фермента [14]. Из приведенных выше данных следует, что SCN^- – быстро окисляющийся субстрат ЛПО молока козы по сравнению с другими естественными субстратами, так как соотношение $K_{\text{кат}}/K_M$ для SCN^- выше, чем для Br^- и Γ (в 395 и 62,5 раза соответственно).

При анализе субстратной специфичности ЛПО молока козы можно сделать вывод, что SCN^- является наиболее предпочтительным субстратом данного фермента, так для этого субстрата характерны наиболее низкое значение K_M и наиболее высокие значения $K_{\text{кат}}$ и $K_{\text{кат}}/K_M$ по сравнению с другими естественными субстратами – Br^- и Γ . Полученные результаты согласуются с литературными данными относительно других пероксидаз [13].

Заключение. ЛПО молока козы при окислении естественных субстратов характеризуется сходным с другими пероксидазами оптимумом pH. Анализ кинетических параметров показал, что ЛПО молока козы по сравнению с другими пероксидазами более эффективно окисляет Br^- . При анализе субстратной специфичности было установлено, что наиболее предпочтительным субстратом ЛПО молока козы является SCN^- .

Результаты исследований кинетических параметров лактопероксидазы молока козы можно использовать в технологических процессах для контроля качества с целью предотвращения деструкции ферментов и ингибирования их активности при производстве продуктов питания и косметических препаратов.

Литература

1. Рогожин В. В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. СПб.: ГИОРД, 2004. С. 32–44.
2. Chance B. // Arch. Biochem. Biophys. 1952. Vol. 41, N 2. P. 416–424.
3. Ghibaudo E., Laurenti E. // Eur. J. Biochem. 2003. N 270. P. 4403–4412.
4. Furtmeller P. G., Jantschko W., Regelsberger G. et al. // Biochemistry. 2002. Vol. 41, N 39. P. 11895–11900.
5. Morrison M., Schonbaum G. R. // Annu. Rev. Biochem. 1976. N 45. P. 861–888.
6. Mazumdar A., Chatterjee R., Adak S. et al. // Biochem. J. 1996. Vol. 314. P. 413–419.
7. Fonteh F. A., Grandison A. S., Lewis M. J. // Inter. J. of Dairy Technol. 2005. N 58. P. 233–236.
8. Chance B. // Arch. Biochem. Biophys. 1984. Vol. 235, N 2. P. 596–611.
9. Metodiewa D., Dunford H. B. // Arch. Biochem. Biophys. 1989. Vol. 272, N 1. P. 245–253.

10. Dumontet C., Rousset B. // J. Biol. Chem. 1983. N 258 (23). P. 14166–14172.
11. Van Leeuwen P. // J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 2000. N 83. P. 15–23.
12. Kussendrager K. D., Van Hooijdonk A. C. // Br. J. of Nutrition. 2000. N 84. Suppl. 1. P. 19–25.
13. Ciaccio C., Gambacurta A., De Sanctis G. et al. // Biochem. J. 2006. N 395. P. 295–301.
14. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия: учебник. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 1998. С. 114–165.

K. Y. KAKHANOUSKAYA, I. V. SEMAK

KINETIC STUDIES OF GOAT MILK LACTOPEROXIDASE

Summary

Lactoperoxidase (LPO) is an oxidoreductase secreted into milk, and plays an important role in protecting the lactating mammary gland and the intestinal tract of the newborn infants against pathogenic microorganisms. A large number of different peroxidases have been purified and characterized, but kinetic parameters of goat lactoperoxidase are still uncertain. The aim of this study was to determine the kinetic parameters of goat milk LPO. K_m values at optimum pH were 0.084 mM, 2.1 mM, 0.75 mM for SCN^- , Br^- , and I^- , respectively. $K_{\text{кат}}$ were 12.5 c^{-1} and 0.72 c^{-1} for SCN^- and Br^- , respectively. $K_{\text{кат}}/K_M$ were $1.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ and $3.8 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ for SCN^- and Br^- , respectively. LPO can be used as a biopreservative agent in food, feed specialties, cosmetics and related products.