

УДК 577.15

КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛАКТОПЕРОКСИДАЗЫ СЫВОРОТКИ МОЛОКА КОРОВЫ

Е. Ю. КОХАНОВСКАЯ¹⁾, И. В. СЕМАК²⁾

¹⁾Белорусский государственный медицинский университет, пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Беларусь

²⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Выявлены кинетические параметры окисления естественных субстратов лактопероксидазы сыворотки молока коровы. Установлена зависимость начальных скоростей окисления естественных субстратов лактопероксидазы молока коровы от значения pH и концентрации фермента. Определены оптимум pH для окисления естественных субстратов лактопероксидазы (тиоцианат-, бромид- и иодид-ионы) и кинетические характеристики фермента. Обнаружено, что лактопероксидаза молока коровы при окислении естественных субстратов характеризуется сходными с другими пероксидазами оптимумом pH и кинетическими параметрами. На основе сравнения константы Михаэлиса, а также с учетом содержания анионов в биологических жидкостях сделан вывод о том, что наиболее предпочтительным субстратом лактопероксидазы молока коровы является тиоцианат-ион. Полученные результаты могут быть использованы для сравнительного анализа кинетических свойств лактопероксидаз разных видов животных, а также для контроля качества при производстве продуктов питания и косметических препаратов, содержащих лактопероксидазу в качестве одного из активных компонентов.

Ключевые слова: лактопероксидаза; сыворотка молока; субстратная специфичность; константа Михаэлиса; каталитическая константа.

KINETIC STUDIES OF COW MILK LACTOPEROXIDASE

К. Ю. КАКХАНОВСКАЯ^a, И. В. СЕМАК^b

^aBelarusian State Medical University, Dzierżyńska Avenue, 83, 220116, Minsk, Belarus

^bBelarusian State University, Niezaliežnasci Avenue, 4, 220030, Minsk, Belarus

Corresponding author: K. Y. Kakhanouskaya (e.kohanovskaya@gmail.com)

The kinetic parameters of oxidation of natural substrates of lactoperoxidase of cow's milk whey were obtained. The correlation between the initial substrate oxidation velocity and pH and enzyme concentration were characterized and kinetic parameters of cow milk lactoperoxidase were determined. Cow's milk lactoperoxidase is characterized by similar optimum pH and kinetic parameters with regard to the oxidation of natural substrates by other peroxidases. The substrate specificity data analysis indicated that the most preferred substrate of cow's milk lactoperoxidase is SCN⁻. The results can be used for comparative analysis of lactoperoxidase kinetic properties of different animal species, as well as for quality control in the manufacture of lactoperoxidase-containing foods and cosmetics.

Key words: lactoperoxidase; milk whey; substrate specificity; the Michaelis constant; the catalytic constant.

Образец цитирования:

Кохановская Е. Ю., Семак И. В. Кинетический анализ лактопероксидазы сыворотки молока коровы // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 66–71.

For citation:

Kakhanouskaya K. Y., Semak I. V. Kinetic studies of cow milk lactoperoxidase. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 66–71 (in Russ.).

Авторы:

Екатерина Юрьевна Кохановская – преподаватель кафедры общей химии факультета профориентации и довузовской подготовки.

Игорь Викторович Семак – кандидат биологических наук, доцент; заведующий кафедрой биохимии биологического факультета.

Authors:

Katsiaryna Kakhanouskaya, lecturer at the department of general chemistry, faculty of career guidance and pre-university training.

e.kohanovskaya@gmail.com

Igor Semak, PhD (biology), docent; head of the department of biochemistry, faculty of biology.

semak@bsu.by

Введение

Лактопероксидаза (ЛПО) – фермент молока, слюны и других биологических жидкостей, имеющий изоэлектрическую точку, равную 9,6, и молекулярную массу около 74 кДа. В естественных условиях ЛПО защищает дыхательные пути, предохраняет молочные железы во время лактации, а также пищеварительный тракт новорожденных от патогенных микроорганизмов [1].

Свои функции лактопероксидаза осуществляет как ЛПО-система (непосредственно фермент, тиоцианат, пероксид водорода). Тиоцианат-ион широко представлен в тканях и секретах животных. Его концентрация в секретах зависит от вида животного [2]. Пероксид водорода, необходимый для работы ЛПО-системы, образуется эндогенно полиморфно-ядерными лейкоцитами в процессе фагоцитоза или продуцируется некоторыми микроорганизмами (*Lactobacillus*, *Streptococcus* и *Lactococcus*) в аэробных условиях [3; 4]. Помимо этого, пероксид водорода может продуцироваться H_2O_2 -генерирующими системами при окислении аскорбиновой кислоты, при окислении глюкозы – глюкозооксидазой, гипоксантина – ксантинооксидазой, а также при магний-зависимом окислении восстановленных пиридиновых нуклеотидов [4].

Первичный продукт реакции – гипотиоцианат – реагирует с тиоловыми группами белков, инактивируя ключевые ферменты микроорганизмов [1].

Благодаря антимикробным свойствам ЛПО имеет широкий спектр применения. Активированную ЛПО-систему можно использовать как бактериостатический агент в молочных продуктах питания, препаратах для лечения инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных, в медицине (офтальмология, стоматология, проктология, гинекология, хирургия), а также в пищевой и косметологической промышленности для увеличения сроков хранения продукции [1].

На данном этапе интерес к использованию лактопероксидазы значительно возрос, однако ее кинетические особенности ранее систематически не исследовались. Цель настоящей работы – изучить кинетические параметры ЛПО молока коровы при окислении естественных субстратов и определить субстратную специфичность этого фермента.

Методы исследования

Начальную скорость окисления естественных субстратов определяли в области линейной зависимости изменения оптической плотности (ОП) во времени, варьируя величину pH раствора (3,8–8,0), тип буферной системы (цитратно-фосфатный буферный раствор – ЦФР, цитратный буферный раствор – ЦБР, ацетатный буферный раствор – АЦБ, фосфатный буферный раствор – ФБР), концентрацию ЛПО сыворотки молока коровы и естественных субстратов, а также пероксида водорода.

Кинетические параметры определяли в оптимуме pH. Окисление TNB (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота), меркаптоэтанол) фиксировали в течение 20 с после добавления H_2O_2 по уменьшению ОП раствора при длине волны 412 нм (при окислении тиоцианат- и бромид-ионов) и по увеличению ОП при длине волны 353 нм (при окислении иодид-ионов). Полученные значения были скорректированы с учетом контроля при окислении TNB в DTNB в отсутствие галогенид- или псевдогалогенид-ионов [5; 6].

Зависимость начальной скорости реакции от концентрации фермента и субстратов выявляли при оптимуме pH и оптимальной концентрации пероксида водорода, установленной опытным путем. Кинетические параметры определяли методами Лайнуивера – Берка и Эдди – Хофсти. Пероксидазную активность оценивали спектрофотометрически на спектрофотометре Solar PV 1251. Активность фермента выражали в международных единицах (МЕ).

Для всех прямых были приняты пороги значимости 95 % и выше. Каждая точка на графиках является усредненным значением, зафиксированным по итогам трех-шести экспериментов. Результаты на графиках представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. Статистический анализ первичных данных проводился при помощи программы Statistica 7.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Лактопероксидаза молока коровы способна окислять различные соединения. К естественным субстратам ЛПО относят тиоцианат-, бромид- и иодид-ионы (SCN^- , Br^- и I^- соответственно). Некоторые авторы установили также окисление хлорид-ионов. В естественных условиях наиболее предпочтительным субстратом является SCN^- , поскольку в биологических жидкостях (слюна, молоко, слеза и пр.) концентрация этого иона, по сравнению с другими субстратами, наибольшая, что обеспечивает достаточную скорость пероксидазной реакции для формирования противомикробных соединений широкого спектра действия [1].

В целях определения кинетических параметров окисления каждого субстрата была установлена зависимость скорости окисления субстратов от концентрации фермента, второго субстрата (пероксид водорода) и значения рН.

При окислении субстрата лактопероксидазой наблюдается прямопропорциональная зависимость скорости окисления субстрата от содержания ЛПО при концентрации фермента 0,1–0,6 нмоль/л (рис. 1). В случае более высокой концентрации скорость реакции возрастает непропорционально концентрации ЛПО.

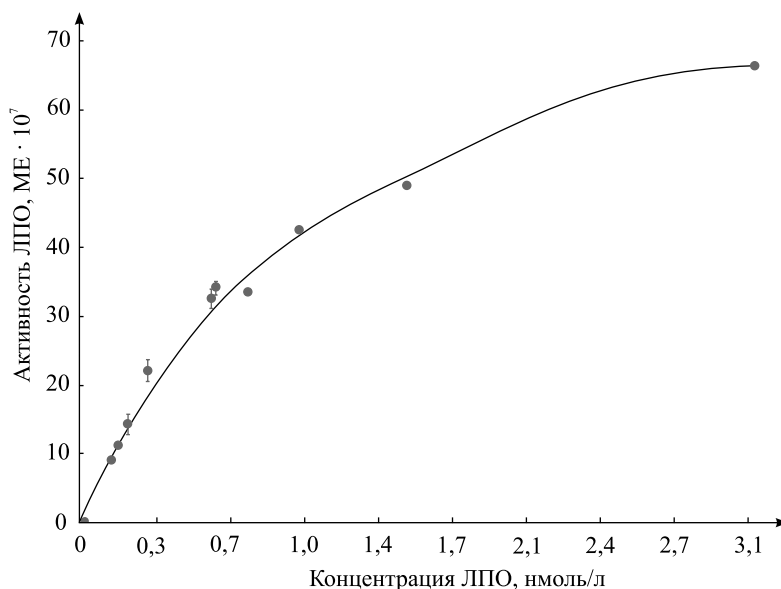


Рис. 1. Зависимость скорости окисления субстрата (концентрация Γ^- составляет 4,3 ммоль/л) от концентрации ЛПО молока коровы

Fig. 1. Dependence of the oxidation rate of the substrate (Γ^- concentration is 4.3 mmol/l) on the concentration of cow's milk lactoperoxidase

Для ЛПО молока козы характерна сходная зависимость. Например, при окислении лактопероксидазой молока козы Γ^- пропорциональное увеличение скорости окисления этого иона также наблюдается при малой концентрации фермента [7].

На скорость окисления естественных субстратов влияет и концентрация второго субстрата пероксидазы – пероксида водорода. При его недостаточной концентрации не будут соблюдены условия, необходимые для определения кинетических параметров, однако в случае превышения оптимальной концентрации пероксида водорода уже в два раза начнется ингибирование фермента. Установлено, что наибольшая скорость окисления субстрата наблюдается при концентрации пероксида водорода 0,04–0,05 ммоль/л (рис. 2), причем начиная с концентрации 0,07 ммоль/л и более скорость реакции резко снижается. Это объясняется ингибированием фермента избытком второго субстрата.

Активность ЛПО зависит также от типа буферной системы. Нами была исследована скорость окисления субстрата в различных буферных системах при разных значениях рН: АЦБ и ЦФР – 5,0; ЦФР, ЦБР и ФБР – 5,8 (рис. 3).

Установлено, что ЛПО молока коровы проявляет наибольшую активность в ацетатном и цитратном буферах при одинаковых значениях рН.

Кроме того, определен оптимальный диапазон рН для каждого из естественных субстратов при их окислении ЛПО (см. таблицу). При окислении Br^- и SCN^- оптимум рН находится в диапазоне от 4,8 до 5,0; при окислении Γ^- – между 4,4 и 6,4. Результаты экспериментов согласуются с полученными ранее данными относительно ЛПО молока козы [7] и с данными других авторов относительно пероксидаз иных видов животных [5; 6]. Оптимальный диапазон рН для ЛПО молока козы в реакции окисления Γ^- также является более широким, чем при окислении других субстратов (от 4,0 до 6,2), в то время как для SCN^- и Br^- оптимум рН находится в диапазоне от 4,6 до 5,6. Сходный оптимум рН при окислении естественных субстратов наблюдается для пероксидазы слюнных желез овцы: Br^- – 5,0; SCN^- – 5,25; Γ^- – 5,5.

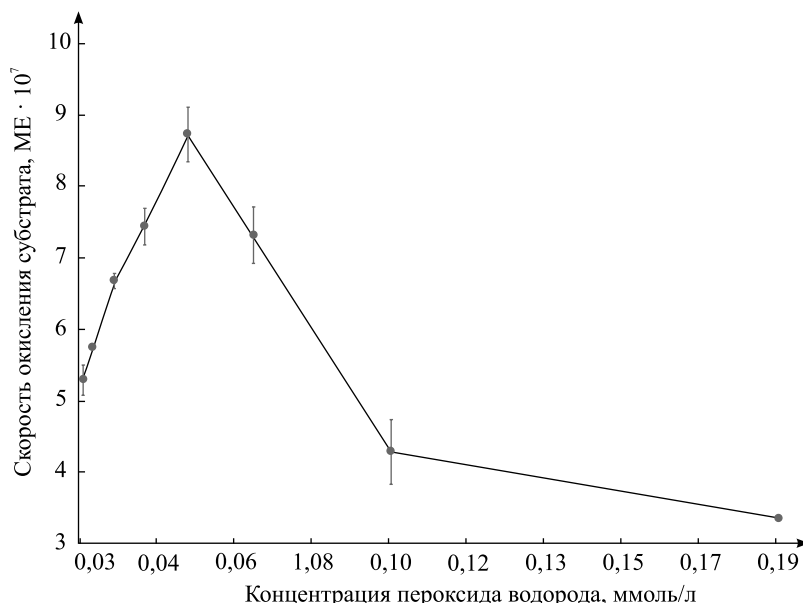


Рис. 2. Зависимость скорости окисления субстрата (концентрация I^- составляет 4 ммоль/л) ЛПО молока коровы от концентрации пероксида водорода (концентрация ЛПО достигает 8,8 нмоль/л)

Fig. 2. Dependence of the oxidation rate of the substrate (I^- concentration is 4 mmol/l) of the cow's LPO on the concentration of hydrogen peroxide (concentration of LPO is 8.8 nmol/l)

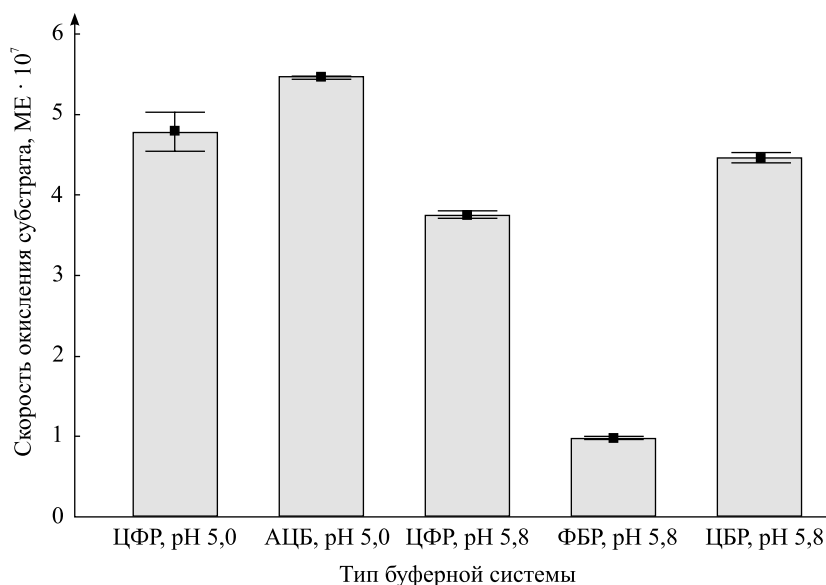


Рис. 3. Активность ЛПО молока коровы в различных буферных системах: концентрация I^- составляет 12 ммоль/л, ЛПО – 0,3 нмоль/л, пероксида водорода – 0,05 ммоль/л

Fig. 3. Activity of cow's milk LPO in various buffer systems: concentration of I^- is 12 mmol/l, concentration of LPO is 0.3 nmol/l, hydrogen peroxide concentration is 0.05 mmol/l

Для определения константы Михаэлиса (K_M), каталитической константы ($K_{кат}$) и их соотношения использовали установленные в ходе предыдущих экспериментов оптимальные значения рН, концентраций фермента и пероксида водорода.

Константа Михаэлиса для ЛПО коровы при окислении SCN^- составляет 0,36 ммоль/л, что соответствует значению K_M для пероксидазы слюнных желез овцы (0,43 ммоль/л) [6]. Наиболее эффективно окисление данного иона происходит при участии ЛПО молока козы [7] и рекомбинантной эозинофильной пероксидазы человека [6]. Константа Михаэлиса ЛПО молока коровы при окислении $Bг^-$ составляет 2,66 ммоль/л, что сравнимо с K_M ЛПО козы при окислении $Bг^-$ (2,1 ммоль/л) и незначительно

превышает значение K_M при окислении $B_2O_2^-$ пероксидазой слюнных желез овцы (1,8 ммоль/л) [6]. Значения K_M при окислении I^- ЛПО молока коровы в целом соответствуют показателям K_M для ЛПО молока козы [7] и пероксидазы слюнных желез овцы [6].

Кинетические параметры ЛПО молока коровы при окислении естественных субстратов

Kinetic parameters of cow's milk LPO during the oxidation of natural substrates

Параметры	Субстрат		
	$B_2O_2^-$	I^-	SCN^-
Оптимум pH	4,6–5,6	4,4–6,4	4,8–5,0
K_M , ммоль/л	2,66	1,28	0,36
$K_{кат}$, c^{-1}	0,66	4,57	0,57
$K_{кат}/K_M$, л/(моль · с)	$2,48 \cdot 10^2$	$3,57 \cdot 10^3$	$1,58 \cdot 10^3$

Таким образом, окисление SCN^- характеризуется наименьшим значением K_M (см. таблицу), в то время как значения K_M для других естественных субстратов ($B_2O_2^-$, I^-) выше. Следовательно, SCN^- является наиболее предпочтительным естественным субстратом для ЛПО молока коровы.

Каталитическая константа при окислении $B_2O_2^-$ для ЛПО молока коровы ($0,66 c^{-1}$) соответствует значениям $K_{кат}$ для ЛПО молока козы и рекомбинантной эозинофильной пероксидазы человека ($0,72 c^{-1}$ и $0,46 c^{-1}$ соответственно) [5; 7]. Таким образом, ЛПО молока козы и коровы, а также эозинофильная пероксидаза человека со сходной эффективностью катализируют окисление $B_2O_2^-$.

Сопоставив значения $K_{кат}$ для ЛПО молока коровы ($4,57 c^{-1}$) и козы ($1,78 c^{-1}$) при окислении I^- , можно сделать вывод о том, что эти ферменты со сравнимой скоростью катализируют окисление данного субстрата. Более высокое значение $K_{кат}$ при окислении I^- по сравнению с другими естественными субстратами объясняется тем, что для установления кинетических параметров использовались разные методики определения активности фермента.

Соотношение $K_{кат}/K_M$ для $B_2O_2^-$ и I^- при их окислении ЛПО молока коровы соответствует аналогичному соотношению для ЛПО молока козы, однако для SCN^- наблюдается различие как по значению $K_{кат}/K_M$ ($1,5 \cdot 10^5$ л/(моль · с) для ЛПО молока козы [7] и $1,58 \cdot 10^3$ л/(моль · с) для ЛПО молока коровы), так и по значению $K_{кат}$ ($12,5 c^{-1}$ для ЛПО молока козы и $0,57 c^{-1}$ для ЛПО молока коровы). Подобные отличия в кинетических характеристиках ферментов могут быть связаны с различиями в первичной структуре ЛПО разных видов животных, а также с особенностями посттрансляционных модификаций молекул фермента в клетках разных организмов.

Заключение

Лактопероксидаза молока коровы при окислении естественных субстратов характеризуется сходными с другими пероксидазами оптимальным pH и кинетическими параметрами. При анализе субстратной специфичности было установлено, что наиболее вероятным субстратом ЛПО молока коровы является SCN^- .

Результаты кинетических исследований ЛПО молока коровы можно использовать для сравнительного анализа свойств лактопероксидаз разных видов животных, что будет способствовать разработке и внедрению новых способов применения этих ферментов в пищевой и фармацевтической промышленности, а также для контроля качества при производстве продуктов питания и косметических препаратов, содержащих ЛПО.

Библиографические ссылки

1. Kussendrager K. D., Van Hooijdonk A. C. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications // B. J. Nutr. 2000. Vol. 84, suppl. 1. P. 19–25.
2. De Wit J. N., Van Hooydonk A. C. M. Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems // Neth. Milk Dairy J. 1996. Vol. 50. P. 227–244.
3. Thomas E. L., Milligan T. W., Joyner R. E., et al. Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci // Infect. Immun. 1994. Vol. 62, issue 2. P. 529–535.
4. Wolfson L. M., Sumner S. S. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system : a review // J. Food Prot. 1993. Vol. 56, № 10. P. 887–892.
5. Ciaccio C., Cambacurta A., De Sanctis G., et al. rhEPO (recombinant human eosinophil peroxidase): expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization // Biochem. J. 2006. Vol. 395, part 2. P. 295–301.

6. Mazumdar A., Chatterjee R., Adak S., et al. Characterization of sheep lacrimal-gland peroxidase and its major physiological electron donor // *Biochem. J.* 1996. Vol. 314. P. 413–419.

7. Кохановская Е. Ю., Семак И. В. Кинетический анализ лактопероксидазы сыворотки молока козы // *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* 2015. № 2. С. 83–87.

References

1. Kussendrager K. D., Van Hooijdonk A. C. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *B. J. Nutr.* 2000. Vol. 84, suppl. 1. P. 19–25.

2. De Wit J. N., Van Hooydonk A. C. M. Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. *Neth. Milk Dairy J.* 1996. Vol. 50. P. 227–244.

3. Thomas E. L., Milligan T. W., Joyner R. E., et al. Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci. *Infect. Immun.* 1994. Vol. 62, issue 2. P. 529–535.

4. Wolfson L. M., Sumner S. S. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system : a review. *J. Food Prot.* 1993. Vol. 56, No. 10. P. 887–892. DOI: 10.4315/0362-028X-56.10.887.

5. Ciaccio C., Cambacurta A., De Sanctis G., et al. rhEPO (recombinant human eosinophil peroxidase): expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization. *Biochem. J.* 2006. Vol. 395, part 2. P. 295–301. DOI: 10.1042/BJ20051385.

6. Mazumdar A., Chatterjee R., Adak S., et al. Characterization of sheep lacrimal-gland peroxidase and its major physiological electron donor. *Biochem. J.* 1996. Vol. 314. P. 413–419.

7. Kakhouskaya K. Y., Semak I. V. Kinetic studies of goat milk lactoperoxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. Belarus. Biol. ser.* 2015. No. 2. P. 83–87 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 17.04.2017.
Received by editorial board 17.04.2017.