



УДК 541.183:577.152.111\*17.03

## ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ

### IV. ВЛИЯНИЕ ЛИПИДОВ И СОЛЕЙ ЖИРНЫХ КИСЛОТ МОЛОКА

© 2000 г. Т. А. Аникеева<sup>#</sup>, В. В. Егоров*Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина,  
109472, Москва, ул. Скрябина, 23*

Поступила в редакцию 11.01.2000 г. Принята к печати 27.03.2000 г.

Изучено влияние поверхностно-активных веществ (ПАВ): липидов и солей жирных кислот, выделенных из молока коров, на активность гемсодержащей пероксидазы хрена в растворе. Обнаружено, что при увеличении концентрации ПАВ скорость ферментативной реакции сначала уменьшается, потом возрастает и далее вновь снижается, в случае солей жирных кислот вплоть до нуля. Начальное снижение скорости реакции является результатом ингибирования фермента; последующее возрастание – результат увеличения доступности для субстрата и возрастания активности каталитического центра фермента в результате его иммобилизации в ассоциатах ПАВ; вторичное уменьшение скорости ферментативной реакции объясняется экранированием белка такими ассоциатами.

В ряду солей жирных кислот и фосфолипидов общий характер зависимости сохраняется при изменении строения поверхностно-активного вещества, однако существенно меняется при переходе к холестерину и сфингомиелину.

*Ключевые слова:* пероксидаза хрена; липиды; соли жирных кислот.

#### ВВЕДЕНИЕ

В работах [2, 3] было установлено, что одноцепочечные ионогенные органические ПАВ в зависимости от концентрации в растворе могут оказывать или ингибирующее, или активирующее влияние на пероксидазу хрена (ЖФ 1.11.1.7; далее – пероксидаза). В то же время известно, что в природных биологических мембранах интегральные белки, к которым относится пероксидаза, находятся в окружении двухцепочечных ПАВ главным образом фосфо- и сфинголипидов. Кроме того, в составе мембран содержится некоторое количество стероидных липидов, в первую очередь холестерина, и солей жирных кислот (СЖК). Природа таких соединений главным образом дифильность их молекул дает основание предположить, что по аналогии с исследованными ПАВ они также могут влиять на активность ферментов [4–6]. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение поведения модельной системы – пероксидазы хрена в присутствии различных концентраций липидов и СЖК в растворе.

Сообщение III см. [1].

Сокращения: ПАВ – поверхностно-активное вещество; СЖК – соли жирных кислот.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 503-41-32).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены значения поверхностного натяжения (силы отрыва пластинки Вильгельми от границы воздух–водный раствор ПАВ [7]) водных растворов липидов и СЖК на границе с воздухом. Видно, что все исследованные соединения уменьшают поверхностное натяжение воды, то есть являются поверхностно-активными, причем поверхностная активность (температура снижения силы отрыва при увеличении концентрации ПАВ в растворе) зависит от строения соединения.

Из зависимостей начальной скорости пероксидазного окисления 5-аминосалициловой кислоты от концентрации ПАВ (рис. 1а–г), видно, что для всех исследованных соединений, кроме сфингомиелина и холестерина (рис. 1, кривые 2 и 4), при увеличении их концентрации в растворе скорость реакции сначала снижается, далее возрастает и, наконец, вновь снижается. Это согласуется с полученными ранее данными для анионных ПАВ [2] и объясняется следующим образом. Начальное снижение скорости реакции (конкурентное ингибирование фермента [3]) может быть результатом адсорбции поверхностно-активных веществ (липидов, СЖК) в “гидрофобном кармане” белка вблизи его активного центра. В пользу этого свидетельствует тот факт, что такие соединения сами подвергаются каталитическому окислению перекисью водорода в присутствии перокси-

Таблица 1. Значения поверхностного натяжения ( $P$ ) водных растворов ПАВ

| ПАВ                  | $C, M$               | $P, мг$ | ПАВ              | $C, M$    | $P, мг$ |
|----------------------|----------------------|---------|------------------|-----------|---------|
| –                    | 0                    | 220     |                  |           |         |
| Фосфатидилэтаноламин | $3.2 \times 10^{-6}$ | 205     | Пальмитат натрия | $10^{-5}$ | 212     |
|                      | $3.2 \times 10^{-5}$ | 187     |                  | $10^{-4}$ | 195     |
|                      | $3.2 \times 10^{-4}$ | 172     |                  | $10^{-3}$ | 175     |
| Фосфатидилсерин      | $3.0 \times 10^{-6}$ | 204     | Пальмитат калия  | $10^{-5}$ | 208     |
|                      | $3.0 \times 10^{-5}$ | 189     |                  | $10^{-4}$ | 185     |
|                      | $3.0 \times 10^{-4}$ | 175     |                  | $10^{-3}$ | 172     |
| Сфингомиелин         | $10^{-5}$            | 187     | Стеарат натрия   | $10^{-5}$ | 201     |
|                      | $10^{-4}$            | 177     |                  | $10^{-4}$ | 188     |
|                      | $10^{-3}$            | 162     |                  | $10^{-3}$ | 162     |
| Холестерин           | $1.2 \times 10^{-5}$ | 195     | Стеарат калия    | $10^{-5}$ | 195     |
|                      | $1.2 \times 10^{-4}$ | 177     |                  | $10^{-4}$ | 177     |
|                      | $1.2 \times 10^{-3}$ | 154     |                  | $10^{-3}$ | 155     |

дазы, что показано методом хемилюминесценции на примере олеатов натрия и калия. Для этих соединений скорости перекисного окисления в воде составляют  $0.8 \times 10^{-7}$  и  $0.7 \times 10^{-7}$   $мМ с^{-1}$ , а в присутствии фермента увеличиваются до  $2.1 \times 10^{-7}$  и  $1.2 \times 10^{-7}$   $мМ с^{-1}$  соответственно.

Наибольший темп снижения скорости при увеличении концентрации ПАВ на данном участке и минимальная ее величина наблюдаются в ряду СЖК для пальмитата калия, обладающего промежуточной поверхностной активностью (табл. 1) и

Таблица 2. Энергия активации ферментативной реакции

| ПАВ                  | Концентрация, $M$    | Энергия активации, $кДж/моль$ |
|----------------------|----------------------|-------------------------------|
| Контроль             | –                    | 45.7                          |
| Пальмитат натрия     | $10^{-3}$            | 35.5                          |
|                      | $10^{-2}$            | 18.9                          |
|                      | $2.5 \times 10^{-2}$ | 8.3                           |
| Стеарат натрия       | $10^{-3}$            | 33.2                          |
|                      | $10^{-2}$            | 18.9                          |
|                      | $2.5 \times 10^{-2}$ | 8.3                           |
| Фосфатидилэтаноламин | $3.2 \times 10^{-4}$ | 23.9                          |
|                      | $3.2 \times 10^{-3}$ | 13.6                          |
|                      | $8.0 \times 10^{-3}$ | 6.0                           |
| Фосфатидилсерин      | $3.0 \times 10^{-3}$ | 29.3                          |
|                      | $3.0 \times 10^{-2}$ | 15.4                          |
|                      | $7.5 \times 10^{-3}$ | 4.5                           |
| Холестерин           | $1.2 \times 10^{-3}$ | 33.2                          |
|                      | $1.2 \times 10^{-2}$ | 18.9                          |
|                      | $3.0 \times 10^{-2}$ | 10.1                          |

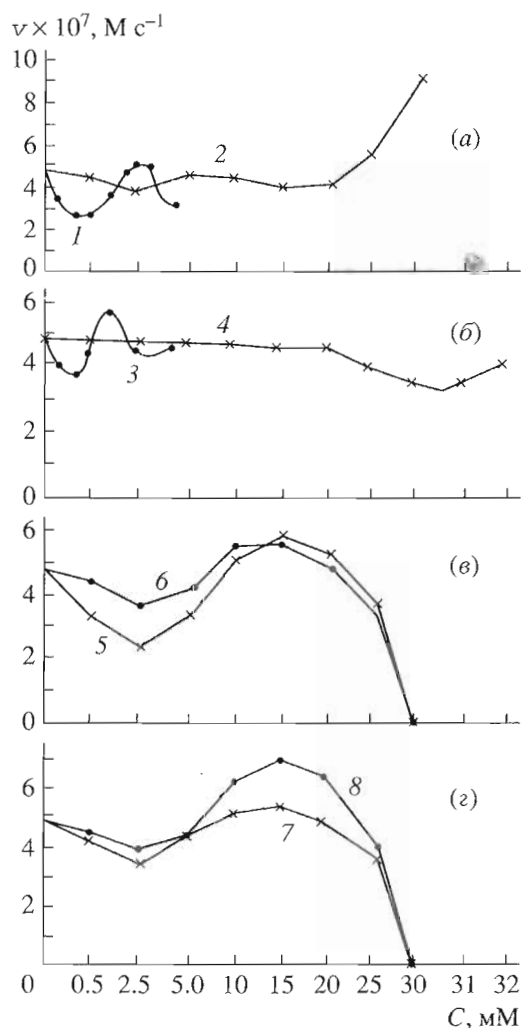
имеющего геометрию и размер молекулы, возможно, наиболее соответствующие размеру полости вблизи активного центра фермента. В ряду липидов аналогичный результат наблюдается также для промежуточного по поверхностной активности фосфатидилэтаноламина (табл. 1).

Последующее возрастание скорости ферментативной реакции на втором участке является, по-видимому, результатом совокупного действия двух факторов: увеличения доступности для субстрата и возрастания активности каталитического центра белка в результате иммобилизации последнего в ассоциатах ПАВ (мицеллах, липосомах). Способность интегральных белков встраиваться в бислои липидов очевидна. В случае жирных кислот и их солей такая возможность вытекает из анализа изотерм сжатия смешанных монослоев белка с ПАВ на границе вода–воздух (рис. 2). Видно, что добавление пероксидазы к слою олеиновой кислоты вызывает его расширение (сдвиг кривой 5 вправо относительно кривой 3) без изменения вида изотермы, что указывает на простое встраивание белка. В случае стеариновой кислоты монослой наоборот сжимается при добавлении пероксидазы (ср. кривые 2 и 4), а при давлении 20  $мН/м$  на нем появляется перегиб, соответствующий структурному переходу в монослое пероксидазы. Это дает основание предположить, что в данном случае фермент не только встраивается в монослой, но и изменяет его структуру (уменьшает площадь монослоя в области высоких давлений), по-видимому, в результате взаимодействия со стеариновой кислотой.

Прямым доказательством увеличения активности пероксидазы под влиянием ПАВ является снижение энергии активации ферментативной реакции (табл. 2), что связано, по-видимому, с из-

менением конформации белка, главным образом в области ближайшего окружения каталитического центра (показано предварительным исследованием кругового дихроизма и кругового магнитного дихроизма пероксидазы). Видно, что энергия активации ферментативной реакции при добавлении фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина снижается более значительно по сравнению с добавлением других ПАВ. Это может быть следствием их способности более существенно изменять конформацию белка по сравнению с СЖК и холестерином.

Можно предположить, что в биологических мембранах указанные фосфолипиды находятся в непосредственном окружении фермента и, по-видимому, способны управлять его активностью. В то же время сфингомиелин и холестерин, как



**Рис. 1.** Зависимость активности пероксидазы от концентрации ПАВ: (а) – фосфатидилэтаноламина (1) и сфингомиелина (2); (б) – фосфатидилсерина (3) и холестерина (4); (в) – пальмитата калия (5) и пальмитата натрия (6); (г) – стеарата калия (7) и стеарата натрия (8).  $[E] 3 \times 10^{-8}$  М,  $[H_2O_2]$  3 мМ,  $[S]$  3 мМ, рН 7.2; 20°C.

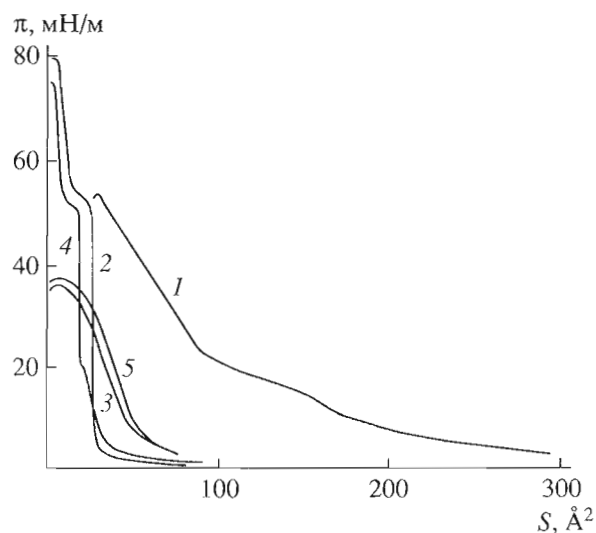
следует из наших данных (табл. 2, рис. 1а, б), не столь существенно влияют на активность пероксидазы.

В области максимальных концентраций липида и СЖК наблюдается вторичное снижение скорости ферментативной реакции, что мы объясняем чисто стерическим фактором – экранированием белка ассоциатами ПАВ, агломераты которых заметны визуально в этой области. При этом не исключается частичная денатурация белка под действием поверхностно-активных веществ, в частности СЖК, где скорость реакции снижается до нуля (рис. 1в, г).

Важно отметить, что в природных мембранах, где исследуемые нами соединения находятся в определенных соотношениях, некоторые из обнаруженных в работе эффектов влияния этих веществ в отдельности на фермент могут быть нивелированы. В частности, при добавлении к пероксидазе смесей фосфолипидов и СЖК, взятых в определенных отношениях, активность фермента на втором участке концентрационной кривой возрастает не столь значительно, как в случае отдельно взятых соединений (предварительные данные).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы ПАВ, выделенные из молока коров черно-пестрой породы по методу Фолча [8]: липиды – фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, холестерин, сфингомиелин; соли жирных кислот – пальмитат натрия, пальмитат калия, стеарат натрия, стеарат калия и перокси-



**Рис. 2.** Изотермы “поверхностное давление–площадь на молекулу” на границе вода–воздух для монослоев пероксидазы (1), стеариновой кислоты (2), олеиновой кислоты (3) и смешанных монослоев пероксидазы со стеариновой кислотой 1 : 50 (4) и пероксидазы с олеиновой кислотой 1 : 50 (5); 20°C.

даза хрена (Reanal, Венгрия) без дополнительной очистки, а также дважды дистиллированная вода.

Активность пероксидазы в концентрации  $3 \times 10^{-8}$  М в водном фосфатном буфере (0.1 М, рН 7.2) при 20°C исследовали спектрофотометрическим методом на СФ-16 при  $\lambda$  455 нм ( $\epsilon$  45000 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>) в соответствии с [9]. Концентрация субстрата – 5-аминосалициловой кислоты 3 мМ. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически ( $\lambda$  403 нм,  $\epsilon$  102100 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> [10]). Погрешность измерения составляла около 10%.

Образцы для исследования готовили следующим образом. В водном фосфатном буфере сначала при 35°C растворяли ПАВ, далее при 20°C – фермент и субстрат, смесь инкубировали 10 мин и прибавляли перекись водорода (3 мМ). Концентрацию пероксида водорода устанавливали методом перманганатометрического титрования [2].

Поверхностное натяжение на границе с воздухом растворов ПАВ в водном фосфатном буфере определяли методом Вильгельми на торсионных весах типа ВТ при 20°C [7].

Энергию активации ферментативной реакции определяли из зависимости  $\ln V$  от  $1/(T, K)$  [11] в интервале температур 16–30°C.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Давлетишин А.И., Егоров В.В. // Биоорганическая химия. 2000. Т. 26. С.
2. Давлетишин А.И., Егоров В.В., Зубов В.П. // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. С. 426–429.
3. Давлетишин А.И., Калабина Н.В., Зайцев С.Ю., Егоров В.В. // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. С. 430–433.
4. Геннис Р. Биомембраны. М.: Мир, 1997. С. 259–267.
5. Sandermann H., McIntyre J.O., Fleisher // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 6201–6208.
6. Blake R., Hager L.P., Gennis R.B. // Biol. Chem. 1978. V. 253. P. 1963–1971.
7. Абрамзон А.А., Боброва Л.Е., Зайченко Л.П., Измайлова В.Н., Новоженец А.А., Рохленко А.А., Туловская З.Д., Шиц Л.А., Ямпольская Г.П. Поверхностно-активные явления и поверхностно-активные вещества. Л.: Химия, 1984. С. 166.
8. Баранова В.С. Липиды молока. Методические указания. М.: МВА, 1985.
9. Лебедева О.М. Кинетика и механизм действия гемсодержащей пероксидазы с органическими субстратами и физиологически активными веществами. Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ, 1980.
10. Smith K.M. Porphyrins and Metalloproteins. Amsterdam: Elsevier, 1975. P. 757–803.
11. Простов Ю.П., Леонова Л.А., Литвишко В.С., Новиков В.Е., Тарутин В.П., Чижова И.Н. Лабораторный практикум по общей и неорганической химии. М.: МВА, 1992. С. 62.

## Effect of Surfactants on Peroxidase Activity. IV. Effect of Milk Lipids and Fatty Acid Salts

T. A. Anikeeva<sup>#</sup> and V. V. Egorov

*Skryabin State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, ul. Skryabina 23, Moscow, 109472 Russia*

The effect of surfactants, lipids and fatty acid salts isolated from cow milk on the activity of heme-containing horseradish peroxidase in solution was studied. As the surfactant concentration increases, the rate of the enzymic reaction successively decreases, increases, and again decreases, down to zero in the case of the fatty acid salts. The initial deceleration of the reaction rate results from the enzyme inhibition. The subsequent increase is caused by an improved accessibility for the substrate and the enhanced activity of the catalytic site of the enzyme due to its immobilization in the surfactant aggregates. A shielding of the protein by these aggregates can explain the secondary deceleration of the enzymic reaction rate. The general character of the dependence is similar and does not depend on the surfactant structure for a series of fatty acid salts and phospholipids; however, it is quite different in the case of cholesterol and sphingomyelin.

*Key words: horseradish peroxidase, lipids, fatty acid salts*

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone +7 (095) 503-4132.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 8. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.