

## БИОХИМИЯ

УДК 577.15:633.521

### **ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ КОМПОНЕНТОВ РЕЦЕПТУРЫ ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ НА ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ ОРТО-ДИФЕНОЛОКСИДАЗЫ ЛЬНА**

**А.Д. Громова, П.С. Лихуша, Г.П. Лапина, М.Н. Петушков**

Тверской государственный университет, Тверь

Определены кинетические параметры каталитической активности орто-дифенолоксидазы в 5-ти системах: с добавлением лимонной кислоты, ацетата натрия, хлорида натрия, тиосульфата натрия и карбоната натрия. Получены и построены для исследованных 5-ти систем спрямленные кинетические зависимости в координатах Лайнуивера–Берка и рассчитаны параметры: константы Михаэлиса, константы каталитические и максимальные скорости ферментативной реакции. Выявлены изменения механизма биокаталитической реакции: при введении в систему ацетата натрия, карбоната натрия и тиосульфата натрия наблюдается псевдоактивация по типу  $V_a$ , при введении хлорида натрия и лимонной кислоты – двухпараметрическая рассогласованная активация по типу  $\Pi_a$ .

**Ключевые слова:** орто-дифенолоксидаза, пищевые системы, активация, кинетические параметры, спрямление в координатах Лайнуивера-Берка, константа Михаэлиса ( $K_M$ ), максимальная скорость ( $V_{max}$ ), константа каталитическая ( $k_{cat}$ ).

**Введение.** В последнее десятилетие актуально использование в производстве хлебобулочных изделий нетрадиционных для хлебопечения культур, содержащих значительное количество легкоусвояемых белков, витаминов и минеральных веществ. К такому сырью относится льняное семя и продукты его переработки. Белки льняного семени (20 – 25% массы) характеризуются высокой биологической ценностью и по аминокислотному составу напоминают белки сои, но с более высоким содержанием серосодержащих аминокислот.

Белки льняного семени могут служить белковыми обогатителями для других растительных продуктов, в том числе хлебобулочных изделий, так как биологическая ценность белка

льняного семени выше, чем белка сои, пшеницы или ржи. В состав льняного белка входят ценные аминокислоты, ряд из которых является незаменимыми.

Важную и практически неисследованную роль в пищевых системах выполняют и ферменты, среди которых особое значение имеет орто-дифенолоксидаза (о-ДФО).

Цель работы: выявить влияние лимонной кислоты (0,882 М), хлорида натрия (0,882 М), ацетата натрия (0,882 М), тиосульфата натрия (0,441 М) и карбоната натрия (0,882 М) на ферментативные параметры биокаталитической системы – орто-дифенолоксидазы льна (о-ДФО).

**Методика.** Ранее нами и коллегами (Гавриленко, 1975; Анисимов, 1978; Методы..., 1982; Лапина, Лихуша, 2010; Лихуша, Лапина, 2014; Громова и др., 2016) изучены ферментативные параметры (определены и рассчитаны значения константы Михаэлиса и константы каталитической) о-ДФО 5-дневных проростков льна сорта Альфа р-1 (система 1).

На данном этапе определены кинетические параметры каталитической активности о-ДФО в 5-ти системах, содержащих о-ДФО льна ( $4,25 \cdot 10^{-5}$  М), пероксида водорода (0,882 М), при варьировании концентрации бензидина ( $10^{-3}$  М) 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6, с добавлением лимонной кислоты (0,882 М) – система 2, хлорида натрия (0,882 М)-система 3, ацетата натрия (0,882 М)-система 4, тиосульфата натрия (0,441 М)- система 5 и карбоната натрия (0,882 М)-система 6, соответственно. По отработанной ранее (Лихуша, Лапина, 2014) схеме получены и построены для исследованных 5-ти систем (рис.) спрямленные кинетические зависимости в координатах Лайнуивера–Берка и рассчитаны параметры  $K_M$  (константы Михаэлиса),  $k_{kat}$  (константы каталитической) и  $V_{max}$  (максимальной скорости ферментативной реакции), представленные в табл.

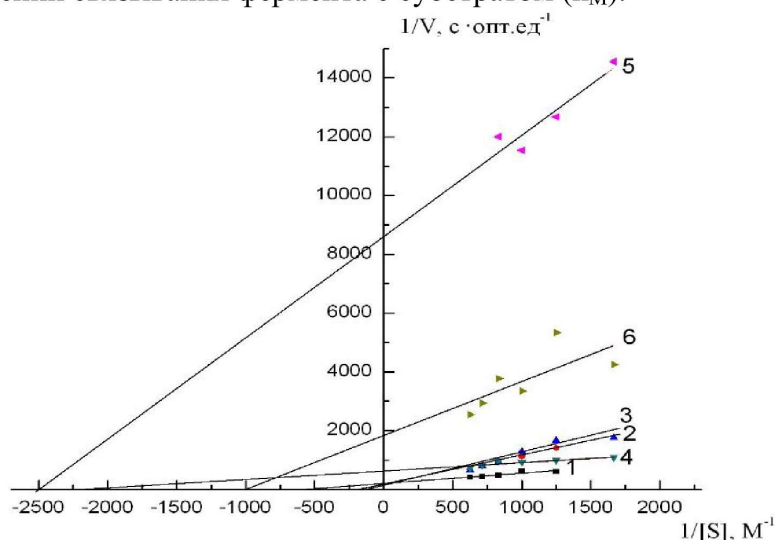
Известно, что значение  $K_M$  характеризует сродство фермента к субстрату. Чем этот параметр меньше, тем сродство выше. Значение  $k_{kat}$  характеризует скорость превращения субстрата: чем константа каталитическая больше, тем быстрее и эффективнее превращается субстрат в ходе каталитической реакции.

**Результаты и обсуждение.** При сравнении полученных в данной работе результатов (табл.) видно, что значение  $K_M$  при добавлении ацетата натрия (система - 2) снижается в 3,9 раза, следовательно, сродство к субстрату повышается. Значение же константы каталитической снижается в 2,9 раз.

При добавлении карбоната натрия (система - 3) значение  $K_M$  уменьшилось, значение  $k_{kat}$  также уменьшилось в 7,6 раз.

Введение в систему - 4 тиосульфата натрия даже в незначительном количестве уменьшает значение  $k_M$  в 4,5 раз, а значение  $k_{kat}$  – в 36 раз. Это свидетельствует о том, что добавление в исследуемые системы ацетата натрия (система - 4), карбоната натрия (система - 6) и тиосульфата натрия (система - 5) сопровождается изменением ферментативного поведения о-ДФО, а именно, псевдоактивацией фермента по типу  $V_a$ . Основная способность реакций  $V_a$  типа активации проявляется в снижении величин максимальных скоростей реакции ( $V < V_{max}$ ) в присутствии таких активаторов при сохранении основного признака активации  $V_a > V_{max}$ .

Абсолютно иная закономерность выявлена при введении в исследуемые системы хлорида натрия (система - 2) и лимонной кислоты (система - 3) (табл.). А именно, наблюдали возрастание значения  $k_M$  в 4,6 и 2,8 раз, и одновременное возрастание значения  $k_{kat}$  в 1,6 и 1,2 раза, соответственно. Согласно принятой в энзимологии классификации типов ингибирования и активации ферментов это – случай двухпараметрически рассогласованной активации, т. е. тип  $Pa$ . Отнесение данного типа к двухпараметрически рассогласованному типу активации ферментов основано на том, что присутствие активатора проявляется в рассогласованности его воздействия на фермент, в увеличении его максимальной скорости реакции ( $V+$ ) и в ослаблении связывания фермента с субстратом ( $k_M$ ).



Р и с у н о к . Спрявленные в координатах двойных обратных величин – координатах Лайнуивера-Берка ( $1/V_0 - 1/[S]_0$ ) - кинетические зависимости водного раствора о-ДФО льна - без добавок (система - 1) и с добавлением лимонной кислоты (система - 2), хлорида натрия (система - 3), ацетата натрия (система - 4), тиосульфата натрия (система - 5), карбоната натрия (система - 6)

Известно, что гидропероксиды и пероксиды, являющиеся субстратами о-ДФО, способны образовывать полимерные и окисленные формы с основными составляющими пищевого продукта – липидами и протеинами, что сообщает образованию темноокрашенных продуктов (в случае хлебобулочных изделий) и, кроме того, токсичных компонентов. Это негативно сказывается на качестве и безопасности продуктов питания. Введение в систему о-ДФО льна ослабляет, а в ряде случаев и полностью снимает эту проблему.

Таблица  
Ферментативные параметры о-ДФО льна в системах 1-6

Порядковый номер исследованной системы	Значения $k_M \cdot 10^3$ , М	Значения $k_{кат,с}^{-1}$
1	1,790	118,8
2	5,050	142,6
3	8,200	193,3
4	0,464	40,5
5	0,397	3,26
6	1,03	15,57

**Заключение.** В зависимости от химической природы добавленного компонента рецептуры пищевой системы мы наблюдали различный характер влияния этого компонента на ферментативные свойства биокатализатора, который входит в состав многих пищевых систем. Знание особенностей взаимодействия компонентов рецептуры пищевых продуктов с о-ДФО и их влияние на активность ферментов, в частности о-ДФО льна, имеет определяющее значение в обеспечении надлежащего качества и безопасности готового пищевого продукта, а введение в рецептуру семян (или проростков) льна – источников о-ДФО, позволяет не только расширить ассортимент хлебобулочной продукции, но и гарантировать ее качество и безопасность.

#### **Список литературы**

- Анисимов В.Д.* 1978. Выделение и некоторые свойства о-дифенолоксидазы картофеля // Биохимия. Т. 43. Вып. 9. С. 1616-1621.
- Гавриленко В.Ф.* 1975. Метод определения ферментативной активности. М. 44 с.

*Громова А.Д., Лихуша П.С., Лапина Г.П.* 2016. Ферментативное поведение орто-дифенолоксидазы в пищевой промышленности // Биотехнология: наука и практика: материалы IV Междунар. науч-практ. конференции. Воронеж. С. 163-166.

*Методы выделения, очистки, количественного определения и исследования физико-химических свойств белков и ферментов.* 1982. Калинин: КГУ. Ч. 1. 30 с., Ч. 2. 32 с.

*Лапина Г.П., Лихуша П.С.* 2010. Закономерности хода ферментативной реакции, катализируемой о-дифенолоксидазой льна при варьировании ионной силы раствора // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. Вып. 20. № 32. С. 23-26.

*Лихуша П.С., Лапина Г.П.* 2014. Иммуобилизация о-дифенолоксидазы льна // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. Вып. 3. № 25. С. 27-30

## **INFLUENCE OF SOME FOOD COMPONENTS ON THE ACTIVITY OF ORTHO-DIPHENOL OXIDASE OF THE FLAX**

**A.D. Gromova, P.S. Lihusha, G.P. Lapina, M.N. Petushkov**

Tver State University, Tver

We defined kinetic parameters of the catalytic activity of the ortho-diphenol oxidase of flax in five systems: with citric acid, with sodium acetate, with sodium chloride, with sodium thiosulfate and with sodium carbonate. For all the systems we built linear kinetic graphs in the Lineweaver-Burk plot. We also calculated Michaelis constants as well as catalytic constants and maximum speed of the enzymatic reactions. We revealed the changes in the mechanism of the biocatalytic reaction. While administering sodium acetate, sodium carbonate and sodium thiosulfate we observed pseudoactivation of Va type; administration of sodium chloride and citric acid activated two-parameter mismatched type IIa.

**Keywords:** *ortho-diphenol oxidase, food systems, activation, kinetic parameters, Lineweaver-Burk plot, Michaelis constant, maximum speed, catalytic constant*

*Об авторах:*

ГРОМОВА Анжела Дмитриевна – магистр кафедры физико-химической экспертизы биоорганических соединений, ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова. д. 33, e-mail: angela.gromova13bio@mail.ru

ЛИХУША Павел Сергеевич – ассистент кафедры физико-химической экспертизы биоорганических соединений, ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова. д. 33, e-mail: Likhusha.PS@tversu.ru

ЛАПИНА Галина Петровна - доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой физико-химической экспертизы биоорганических соединений, ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 33, e-mail: Galina.Lapina@tversu.ru.

ПЕТУШКОВ Михаил Николаевич – кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии, ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова. д. 33, e-mail: Petushkov.MN@tversu.ru

Громова А.Д. Влияние некоторых компонентов рецептуры пищевых систем на верментативное поведение орто-дифенилоксидазы льна / А.Д. Громова, П.С. Лихуша, Г.П. Лапина, М.Н. Петушков // Вестн. ТвГУ. Сер.: Биология и экология. 2016. № 4. С. 61-66.