

БИОХИМИЯ

УДК 577.15:633.521

ОРИЕНТИРОВОЧНАЯ КАЛИБРОВОЧНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ДЛЯ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК—РЕГУЛЯТОРОВ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ОРТО-ДИФЕНОЛОКСИДАЗЫ

Г.П. Лапина, П.С. Лихуша, А.Д. Громова
Тверской государственный университет, Тверь

Определены кинетические параметры каталитической активности орто-дифенолоксидазы в четырёх системах: с добавлением лимонной кислоты, ацетата натрия, карбоната натрия и без добавок. Получены и построены для исследованных 4-х систем спрямленные кинетические зависимости в координатах Лайнуивера-Берка и рассчитаны параметры: константы Михаэлиса, константы каталитические и максимальные скорости ферментативной реакции. Получено диаграммное представление данных по ферментативной кинетике, которое может служить ориентировочной калибровочной зависимостью при подборе пищевых добавок.

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

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

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

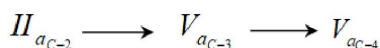
Определены кинетические параметры каталитической активности о-ДФО в 4-х системах, содержащих о-ДФО льна ($4,25 \cdot 10^{-5}$ М), пероксида водорода (0,882 М), при варьировании концентрации

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 (С-2), ацетата натрия (0,882 М) – система 3 (С-3), и карбоната натрия (0,882 М) – система 4 (С-4), соответственно. По отработанной ранее [6] схеме получены и построены для исследованных 4-х систем 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 (Громова и др., 2016а,б).

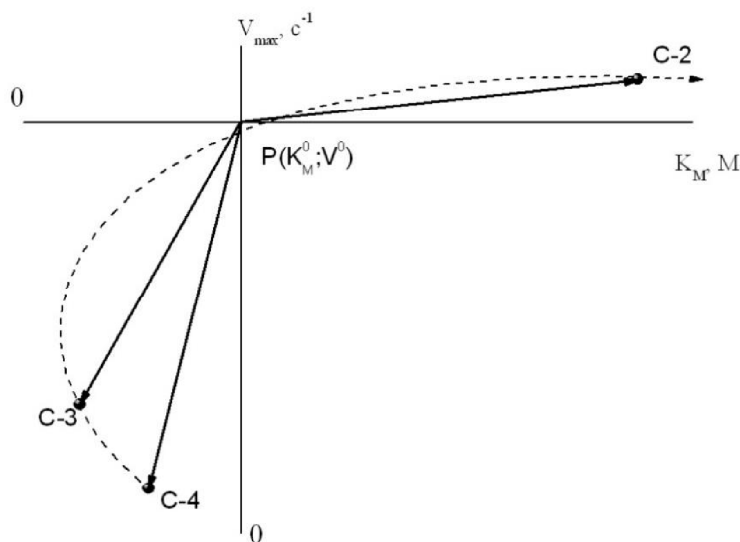
Результаты и обсуждение. С использованием оригинального метода построения геометрического «портрета» изучаемой реакции в трехмерной $K_M \cdot V$ – системе прямоугольных координат рассчитали дополнительные ферментативные параметры (длины $p\vec{\Pi}a_{C-2}$ -, $p\vec{V}a_{C-3}$ -, $p\vec{V}a_{C-4}$ - векторов).

Построение диаграммных представлений о-ДФО – реакции в двухмерной $K_M \cdot V_{max}$ – системе координат позволяет определить совокупность следующих дополнительных характеристик ферментативного процесса:

1. Обнаружена смена типов реакций активации с изменением эффектора в реакционной смеси:



Лимонная кислота \longrightarrow Ацетат натрия \longrightarrow Карбонат натрия



Р и с у н о к . Диаграммное представление данных по ферментативной кинетике

Из рисунка видно, что возрастание угла наклона каждого из векторов от $p\vec{V}_{a_{c-4}}$ к $p\vec{V}_{a_{c-3}}$ и далее до $p\vec{V}_{a_{c-2}}$ к оси K_M свидетельствует об изменении механизма течения химической реакции окисления бензидина, катализируемой о-ДФО при изменении активатора.

2. Изменение интенсивности ферментативной реакции характеризуется изменением длин $p\vec{V}_{a_{c-2}}$, $p\vec{V}_{a_{c-3}}$ и $p\vec{V}_{a_{c-4}}$ - векторов, рассчитанных по формуле:

$$PV_i = \sqrt{(k_M^i - k_M^0)^2 + (V^i - V^0)^2}$$

Тип активации $\Pi_{a_{c-2}} \longrightarrow V_{a_{c-3}} \longrightarrow V_{a_{c-4}}$

Длина вектора $3,30 \cdot 10^{-3} \longrightarrow 3,71 \cdot 10^{-3} \longrightarrow 4,56 \cdot 10^{-3}$

Добавка С-2: С-3: С-4:
Лимонная кислота Ацетат натрия Карбонат натрия

Видно, что внесение исследованных пищевых добавок меняет интенсивность течения ферментативной реакции с участием о-дифенолоксидазы льна, а именно введение в исходную систему лимонной кислоты (случай двухпараметрически рассогласованного ингибирования) длина вектора $p\vec{V}_{a_{c-2}}$ составляет $3,30 \cdot 10^{-3}$ условных единиц.

При внесении добавки ацетата натрия наблюдается смена типа эффектирования фермента: двухпараметрически рассогласованная активация меняется на псевдоактивацию, а длина вектора $p\vec{V}_{a_{c-3}}$ увеличивается в 1,1 раза, что указывает на повышение интенсивности хода каталитической реакции. Последующая добавка (карбонат натрия) приводит к возрастанию длины вектора $p\vec{V}_{a_{c-4}}$ в 1,2 раза. В такое же число раз увеличивается интенсивность хода ферментативной реакции, катализируемой о-ДФО льна.

Итак, привлечение метода диаграммных построений в двумерной $K_m V^i$ - системе координат позволило получить визуализацию изменений эффектирования о-ДФО при смене химической природы пищевых добавок, а также рассчитать дополнительные ферментативные характеристики: длины соответствующих векторов и провести конкретизацию ферментативного поведения о-ДФО при внесении добавок: установлено изменение не только механизма, но и интенсивности хода ферментативной реакции.

Если бы в реакции типа V_a начали увеличивать только V^i -параметр (путём внесения соответствующего активатора), то при своём

вращении вверх диаграммный вектор $p\vec{V}_{a_{c-4}}$ занял бы положение вектора $p\vec{V}_{a_{c-3}}$, а затем сместился бы в поле первого квадранта $K_M'V'$ – системы координат, где он (теперь уже вектор $p\vec{I}_{a_{c-2}}$) характеризовал бы протекание реакции типа Π_a . Это означало бы такую последовательность смен типов реакций активирования фермента: $V_{a_{c-4}} \rightarrow V_{a_{c-3}} \rightarrow \Pi_{a_{c-2}}$. Вращение вектора в $K_M'V'$ – системе координат не только показывает, к какой смене данного типа реакции это будет приводить, но и с помощью воздействия на какой из параметров легче этого достигнуть.

Следовательно, полученное диаграммное представление данных по ферментативной кинетике (рисунок) может служить ориентировочной калибровочной зависимостью при подборе пищевых добавок, регулирующих ферментативное поведение о-ДФО.

Список литературы

- Анисимов В.Д.* 1978. Выделение и некоторые свойства о-дифенолоксидазы картофеля // Биохимия. Т.43. Вып. 9. С. 1616-1621.
- Гавриленко* 1975. Метод определения ферментативной активности. 44 с.
- Громова А.Д., Лихуша П.С., Лапина Г.П.* 2016а. Ферментативное поведение орто-дифенолоксидазы в пищевой промышленности // Биотехнология: наука и практика: материалы IV Международной научно-практической конференции. Воронеж. С. 163-166.
- Громова А.Д., Лихуша П.С., Лапина Г.П., Петушков М.Н.* 2016б. Влияние некоторых компонентов рецептуры пищевых систем на ферментативное поведение орто-дифенолоксидазы льна // Вестн. ТвГУ. Сер.: Биология и экология». № 4. С. 61-66.
- 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.
- Методы выделения, очистки, количественного определения и исследования физико-химических свойств белков и ферментов.* 1982. К.: КГУ. Ч. 1. 30 с. Ч. 2. 32 с.

**ORIENTAL CALIBRATION DEPENDENCE FOR FOOD
ADDITIVES-REGULATORS OF ENZYMATIC ACTIVITY
ORTHO-DIPHENOLOXIDASE**

G.P. Lapina, P.S. Likhusha, A.D. Gromova

Tver State University, Tver

The kinetic parameters of the catalytic activity of ortho-diphenol oxidase in four systems are determined: with the addition of citric acid, sodium acetate, sodium carbonate and without additives. Straightened kinetic dependencies are calculated and constructed for the four systems studied. The following parameters are calculated: Michaelis constants, catalytic constants, and maximum rates of the enzymatic reaction. A diagrammatic representation of the data on enzyme kinetics is obtained. The representation can serve as an approximate gauge dependence for the selection of food additives.

Keywords: *ortho-diphenol oxidase, food systems, activation, kinetic parameters, straightening in the coordinates of Linuiver-Burke, Michaelis constant (K_M), maximum speed (V_{max}), catalytic constant (k_{cat})*

Об авторах:

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.

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

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

Громова А.Д. Ориентировочная калибровочная зависимость для пищевых добавок-регуляторов ферментативной активности орто-дифенилоксидазы / А.Д. Громова, П.С. Лихуша, Г.П. Лапина // Вестн. ТвГУ. Сер.: Биология и экология. 2017. № 4. С.56-60.