

УДК 577.15:633.521

ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ КАК ЭФФЕКТОРЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ОРТО-ДИФЕНОЛОКСИДАЗЫ

П.С. Лихуша, Г.П. Лапина

Тверской государственный университет
Кафедра биохимии и биотехнологии

Определены кинетические параметры каталитической активности орто-дифенолоксидазы в пяти системах: с добавлением тиосульфата натрия, ацетата натрия, карбоната натрия, хлорида натрия и без добавок. 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. Получено диаграммное представление данных по ферментативной кинетике.

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

DOI 10.26456/vtchem2019.4.19

Ферменты, в том числе и орто-дифенолоксидаза (о-ДФО) играют важную роль в пищевых системах. И то, как они будут проявлять свою активность, зависит от компонентов системы.

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

Методика. Ранее [1 – 6] 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 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 тиосульфата натрия (0,882 М) – система 2 (С-2), ацетата натрия (0,882 М) – система 3 (С-3), карбоната натрия (0,882 М) – система 4 (С-4), и хлорида натрия (0,882 М) – система 5 (С-5) соответственно. По отработанной ранее [3] схеме получены и построены для исследованных 5-ти систем спрямленные кинетические зависимости в координатах Лайнуивера–

Берка и рассчитаны параметры K_M (константы Михаэлиса) и V_{max} (максимальной скорости ферментативной реакции), представленные в [3, 5 – 8].

Результаты и обсуждение

С использованием оригинального метода построения геометрического «портрета» изучаемой реакции в двухмерной $K_M \backslash V$ – системе прямоугольных координат рассчитали дополнительные ферментативные параметры (длины $\overrightarrow{Pva_{C-2}}$, $\overrightarrow{Pva_{C-3}}$, $\overrightarrow{Pva_{C-4}}$, $\overrightarrow{Pva_{C-5}}$ - векторов).

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

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

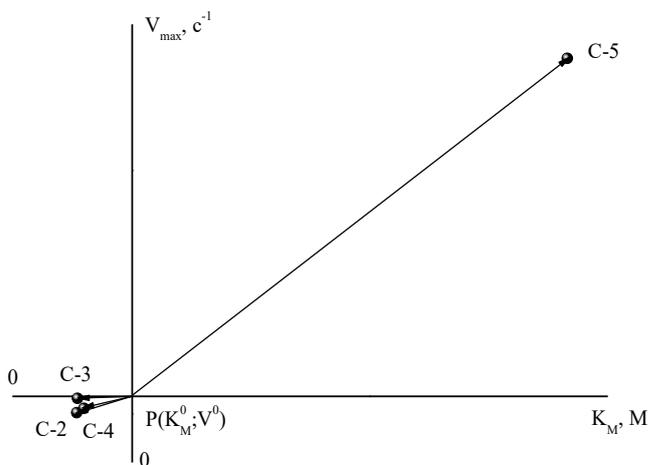
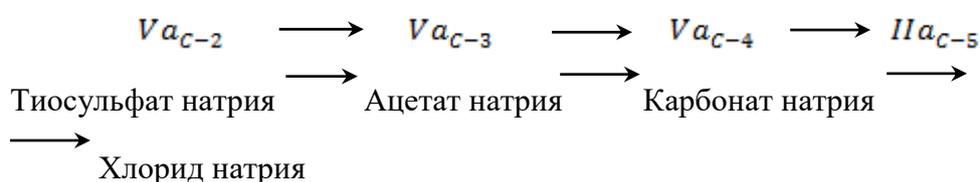


Рис. Диаграммное представление данных по ферментативной кинетике

Видно (рис.), что изменение угла наклона каждого из векторов к оси K_M свидетельствует об изменении механизма течения химической

реакции окисления бензидина, катализируемой о-ДФО при изменении эффектора.

2. Изменение интенсивности ферментативной реакции характеризуется изменением длин $\overrightarrow{PVa_{C-2}}$, $\overrightarrow{PVa_{C-3}}$, $\overrightarrow{PVa_{C-4}}$, $\overrightarrow{PIIa_{C-5}}$ -векторов, рассчитанных по формуле:

$$\overrightarrow{PVa} = \sqrt{(K'_M - K_M^0)^2 + (V' - V^0)^2}$$

Тип активации	$Va_{C-2} \longrightarrow$	$Va_{C-3} \longrightarrow$	$Va_{C-4} \longrightarrow$	$PIIa_{C-5}$
Длина вектора	$5,12 \cdot 10^{-3}$	$3,61 \cdot 10^{-3}$	$4,56 \cdot 10^{-3}$	$5,08 \cdot 10^{-2}$
Добавка	C-2:	C-3:	C-4:	C-5

Видно, что внесение исследованных пищевых добавок меняет интенсивность течения ферментативной реакции с участием о-дифенолоксидазы льна, а именно введение в исходную систему тиосульфата натрия (случай псевдоактивации) длина вектора $\overrightarrow{PVa_{C-2}}$ составляет $5,12 \cdot 10^{-3}$ условных единиц.

При внесении добавки ацетата натрия длина вектора Va_{C-3} уменьшается в 1,4 раза, что указывает на понижение интенсивности хода каталитической реакции. Последующая добавка (карбонат натрия) приводит к возрастанию длины вектора Va_{C-4} в 1,3 раза. В такое же число раз увеличивается интенсивность хода ферментативной реакции, катализируемой о-ДФО льна. При внесении в систему хлорида натрия наблюдается смена типа эффектирования фермента: псевдоактивация меняется на двухпараметрически рассогласованную активацию, а длина вектора $\overrightarrow{PIIa_{C-5}}$ увеличивается в 11 раз.

Итак, привлечение метода диаграммных построений в двухмерной $K_M V$ - 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.

Следовательно, применение добавок в пищевой промышленности влияет на ферментативную активность о-ДФО, а в некоторых случаях это влияние очень значительно.

Список литературы

1. Анисимов В.Д. и др. // Биохимия. 1978 т.43, вып.9, С.1616–1621.
2. Гавриленко и др. Метод определения ферментативной активности. М.: 1978. 44 с.
3. Громова А.Д., Лихуша П.С., Лапина Г.П. Ферментативное поведение орто-дифенолоксидазы в пищевой промышленности // Материалы IV Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика», Воронеж, 2016. с. 163 – 166.
4. Методы выделения, очистки, количественного определения и исследования физико-химических свойств белков и ферментов. 1982 К.: Изд-во Калинин. Гос. ун-та, Ч. 1. 30 с. , Ч. 2. 32 с.
5. Лапина Г.П., Лихуша П.С. // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2010. Вып. 20. № 32. С. 23 – 26.
6. Лихуша П.С., Лапина Г.П. // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2014. Вып. 3. № 25. С. 27 – 30.
7. Громова А.Д., Лихуша П.С., Лапина Г.П., Петушков М.Н. // Вестник ТвГУ. Серия «Биология и экология», 2016. №4. С. 61-66.
8. Лапина Г.П., Лихуша П.С., Громова А.Д. // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2017. № 4. С. 56 – 60.

FOOD ADDITIVES AS EFFECTORS OF ENZYMATIC ACTIVITY ORTO-DIPHENOLOXIDASE

P.S. Likhusha, G.P. Lapina

Tver State University, Tver
Department of Biochemistry and Biotechnology

Kinetic parameters of catalytic activity of ortho-diphenol oxidase are determined in five systems: with addition of sodium thiosulfate, sodium acetate, sodium carbonate, sodium chloride and without additives. Flattened kinetic dependencies in Linuiver-Burke coordinates were obtained and constructed for the studied 5 systems and parameters were calculated: Michaelis constants, catalytic constants and maximum rates of enzymatic reaction. A diagram representation of enzymatic kinetics data was obtained.

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

Об авторах:

ЛИХУША Павел Сергеевич – старший преподаватель кафедры биохимии и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», e-mail: Likhusha.PS@tversu.ru

ЛАПИНА Галина Петровна - доктор химических наук, профессор, e-mail: Galina.Lapina@tversu.ru.

Поступила в редакцию 18 ноября 2019 г.