

УДК 543.94
DOI 10.26456/vtchem2025.3.13

ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ О-ДИФЕНОЛОКСИДАЗЫ В КАЧЕСТВЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОКИСЛЕНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ

П.С. Лихуша, Н.А. Кудряшова

ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», Тверь

Перспективы прикладного использования иммобилизованных ферментов и удобства при проведении как теоретических, так и практических исследований привлекают внимание не только учёных, но и производителей. Длительность сохранения каталитической активности и ряд свойств ферментов определяются правильностью выбора носителя, метода и условий проведения иммобилизации. Данная методика позволяет быстро определить степень окисления масел посредством визуальной оценки изменений цвета на тест-системе.

Ключевые слова: о-дифенолоксидаза (о-ДФО) биотканей льна, бензидин, тест-система, растительные масла

Введение

Искусство иммобилизации ферментов заключается в правильном выборе метода, который определяется рядом факторов, многие из которых невозможно определить до испытания метода. Основные критерии выбора включают:

1. Стабильность фермента в условиях реакции.
2. Избегание реагентов, образующих поперечные сшивки с группами, отсутствующими в активном центре фермента.
3. Защиту активного центра фермента любым доступным способом.
4. Учет механических свойств носителя, особенно его прочности и физической формы.

На сегодняшний день известно множество методов иммобилизации, получены сотни нерастворимых производных ферментов, а также показана возможность их многократного и продолжительного использования. Разработаны технологические процессы, методики анализа и некоторые терапевтические процедуры на основе применения иммобилизованных ферментов.

Методы иммобилизации биологически активных веществ делятся на две основные группы: молекулярную иммобилизацию и иммобилизацию в растворе. Связи между ферментами и субстратами

© Лихуша П.С., Кудряшова Н.А., 2025

быть адсорбционными, ковалентными или механическими (удерживание молекул фермента трехмерной сеткой цепей полимерного носителя). Также возможны комбинированные методы связывания.

Физическая адсорбция осуществляется очень просто: адсорбент и фермент перемешивают в течение определенного времени. Связь происходит за счет ионных, гидрофобных или ван-дер-ваальсовых сил.

В качестве носителей чаще всего используют двуокись кремния (силикагель) или стекло. На этих материалах иммобилизованы такие ферменты, как глюкозооксидаза, цитохром с, малатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа, каталаза, гексокиназа, амилаглюкозидаза, трипсин, химотрипсин, папаин, щелочная протеиназа, кислая фосфатаза, РНКаза и аминоксилаза [1].

Одним из таких носителей являются пластины для тонкослойной хроматографии Silufol (Чехия). Они представляют собой алюминиевую фольгу с нанесенным на нее силикагелем. Пластины могут содержать инертный неорганический люминесцентный индикатор UV-254 или UV-365. Они запечатаны в полиэтиленовой упаковке с защитным слоем бумаги.

Исследования показывают, что иммобилизация не приводит к существенным изменениям каталитических свойств ферментов. В большинстве случаев параметры действия ферментов — такие как каталитические константы, энергия активации, оптимум по pH и температуре — остаются практически неизменными. Однако снижение удельной активности при фиксации может быть обусловлено химической модификацией групп активного центра, экранированием доступа субстрата или изменением конформации белковой молекулы.

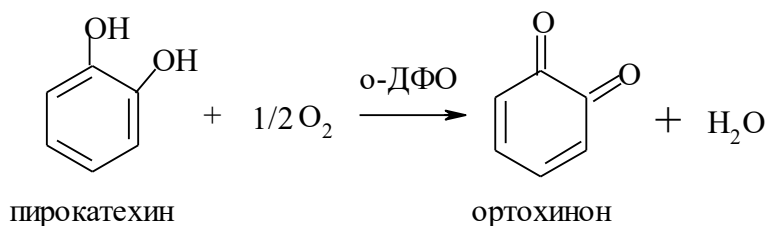
Иммобилизация способствует увеличению стабильности ферментов.

Под влиянием ряда сложных химических превращений при окислении в жирах и маслах происходит накопление специфических продуктов распада триглицеридов — свободных жирных кислот, перекисей и гидроперекисей, карбонильных соединений — альдегидов и кетонов, жирных спиртов, оксиполимеров, которые в дополнение к прогорклому вкусу и запаху могут обуславливать распад витаминов, а также оказывать возможное токсическое влияние и даже деструктивные изменения в пищеварительном тракте. Это диктует необходимость контролировать качество масел, используемых в пищу. Одним из важнейших показателей окисленности масел является перекисное число, характеризующее содержание перекисей и гидроперекисей в масле [2].

О-дифенолоксидаза (о-ДФО) является купропротеином — содержит медь (около 0,2% меди в препарате). В свежеприготовленных

препаратах медь находится преимущественно в восстановленной форме. Связь меди с ферментом при попытке связать её полностью приводит к инактивации фермента.

Типовая реакция, катализируемая о-ДФО такова:



В результате действия этого фермента о-фенол превращается в о-хинон. Однако хиноны сами по себе не окрашены темным цветом; темный оттенок появляется вследствие дальнейшего окисления хинонов и полимеризации продуктов окисления с образованием тёмноокрашенных веществ.

о-ДФО участвует в окислении водорода (отнятого дегидрогеназами у различных субстратов), используя кислород воздуха.

Структура активного центра о-ДФО близка к катехиноксидазе — еще более изученному купропротеиду [3]. В двудерном медном центре катехиноксидазы происходит окисление катехина через четырехэлектронное восстановление кислорода до воды. Молекулярный кислород связывается с двумедным центром после замещения молекул растворителя CuA в восстановленной форме фермента.

Модель связывания субстрата предполагает шестикоординационную связь CuВ с His 240, His 244 и кислородом; His 274 и катехин занимают осевые позиции в искаженной октаэдрической координации благодаря Cu(II) с девятью d-электронами. Область CuА сохраняет тетрагональную координацию с His 88, His 118; O₂ занимает экваториальную позицию; His 109 — осевую; свободное шестое место остается доступным для координации.

Материалы и методика

Для обнаружения перекисей в растительных маслах применяют метод, описанный в ГОСТ 26593-85 Масла растительные. Метод определения перекисного числа. Метод основан на реакции взаимодействия продуктов окисления растительных масел и жиров (перекисей и гидроперекисей) с йодистым калием в растворе уксусной кислоты и хлороформа и последующем количественном определении выделившегося йода раствором тиосульфата натрия титриметрическим методом [4].

Также возможно использование реакции пероксидазы с бензидином [5]. В присутствии H_2O_2 и пероксидазы (РРО) бензидин образует синее соединение с последующим разложением до бурого вещества.

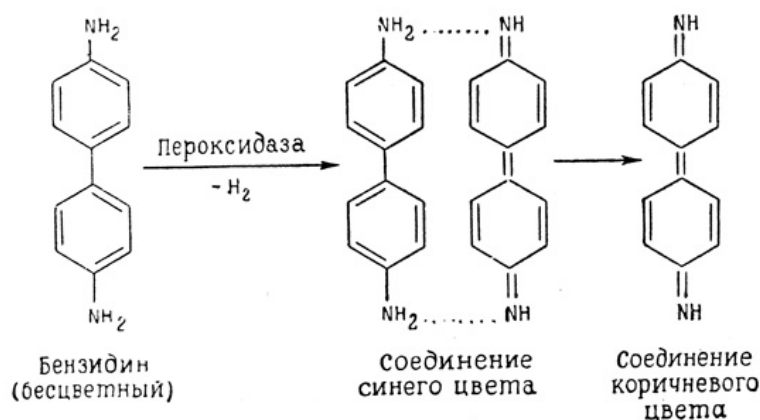


Рис. Реакция пероксидазы с бензидином

Для устранения диффузии реактивов добавляют молибденовокислый аммоний — он осаждает окрашенное соединение.

Суть реакции: пероксидаза разлагает перекись водорода с образованием кислорода; он окисляет бензидин до окрашенного соединения. В результате образуется парахинондиимид — соединение синего цвета с недоокисленным бензидином — которое затем переходит в бурый оттенок.

Реакция протекает следующим образом: наливают 2 мл вытяжки (развод 1:4), добавляют 5 капель 0,2%-ного раствора бензидина и 2 капли 1%-ного раствора H_2O_2 . При положительной реакции через 0,5–1,5 минуты появляется сине-зеленый цвет с последующим переходом в буро-коричневый оттенок. Слабая реакция проявляется появлением цвета через некоторое время; отрицательная — отсутствие синего цвета сразу после добавления реагентов.

Для определения окисления растительных масел предлагается следующая тест-система: носитель — пластинка Silufol с нанесенной иммобилизованной о-ДФО; на пластинку наносятся капли растворов бензидина и молибденовокислого аммония поочередно с последующим высушиванием. Размер капель около 6 мм; окраска развивается за 5 минут [6].

Далее готовили растворы пероксида водорода разбавлением исходного ($2,283 \cdot 10^{-2}$ М). Концентрация самого разбавленного раствора, соответственно, составляла $1,083 \cdot 10^{-2}$ М, на три порядка больше

концентрации фермента. Разность между концентрациями составляет 2 мМ.

Далее проводили непосредственное погружение иммобилизованных форм в растворы H_2O_2 . После чего проводили просушивание и сканирование, а затем сравнение интенсивности окрашенных зон.

Результаты и обсуждение

Оказалось, что чем больше концентрация перекиси водорода, тем интенсивнее окраска пятен. Данный результат подтверждает, что иммобилизация прошла успешно и реакция с участием фермента о-ДФО идёт как в объёме водного раствора, так и на твердом носителе, на котором иммобилизован фермент.

Заключение

Данная методика позволяет быстро определить степень окисления масел посредством визуальной оценки изменений цвета на тест-системе.

Список литературы

1. Кёстнер А.И. Иммобилизованные ферменты. // Успехи химии, Т. XLIII, вып. 8, 1974 – С. 1480 – 1511
2. Мурашова Д.Н., Макарова Н.В. Накопление вторичных продуктов окисления в растительных маслах при термо- и микроволновой обработке // Известия Вузов. Пищевая технология, № 5-6, 2009, С. 21-23
3. Klaubunde T., Eicken C., Sacchettini J. C., Krebs B. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. // Nat. Struct. Biol.- 1998. - № 5. – P.1084-1090
4. ГОСТ 26593-85 Масла растительные. Метод определения перекисного числа. Vegetable oils. Method for measurement of peroxide value. Разработан Министерством пищевой промышленности СССР. Утверждён 25.07.1985. Введён 01.01.86
5. Паламарчук И.А., Веселова Т.Д. Изучение растительной клетки – Москва: Просвещение, 1969 – С. 175
6. Лихуша П.С., Лапина Г.П. Иммобилизация о-дифенолоксидазы льна. // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология. 2014. № 3. С.27 – 30.

Об авторах:

ЛИХУША Павел Сергеевич – старший преподаватель кафедры биохимии и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет» (170100, Тверь, ул. Желябова. д. 33); e-mail: Likhusha.PS@tversu.ru

КУДРЯШОВА Наталья Александровна – старший преподаватель кафедры биохимии и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет» (170100, Тверь, ул. Желябова. д. 33); e-mail: Kudryashova.NA@tversu.ru

USE OF IMMOBILISED O-DIPHENOL OXIDASE AS A TEST SYSTEM FOR DETERMINING OXIDATION OF VEGETABLE OILS

P.S. Likhusha, N.A. Kudryashova

Tver State University, Tver

The prospects for the applied use of immobilized enzymes and convenience in conducting both theoretical and practical studies attract the attention of not only scientists, but also manufacturers. The duration of catalytic activity and a number of enzyme properties are determined by the correct choice of carrier, method and conditions for immobilization. This method allows to quickly determine the oxidation state of oils by visual evaluation of color changes on the test system.

Keywords: *o-diphenol oxidase (o-DFO) of flax biotissues, benzidine, test system, vegetable oils*

Дата поступления в редакцию: 21.07.2025.

Дата принятия в печать: 28.07.2025.