

ДОСЛІДЖЕННЯ КІНЕТИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ГІДРОЛІЗУ БІОКОМПЛЕКСОМ ІНГІБІТОР АМІЛАЗИ-ГІДРОЛІЗАТ КОЛАГЕНУ

Дзюба Н. А., к.т.н., доцент кафедри
технології ресторанного і оздоровчого харчування
<https://orcid.org/0000-0001-6609-3965>
Одеський національний технологічний університет, Одеса, Україна

<https://doi.org/10.31073/foodresources2025-25-10>

Предмет. Ферменти та інгібітори є нестабільними до дії зовнішніх факторів (температури, рН), тому постає питання їх стабілізації шляхом іммобілізації на біоматрицях. Дослідження іммобілізації за допомогою ІЧ-спектроскопії дозволяє з більшою точністю говорити про процес взаємодії інгібітору ферментів та біоматриці. **Мета.** Дослідження кінетичної характеристики біокомплексу на основі інгібітору панкреатичної амілази та гідролізату колагену. **Методи.** Визначення активності ферменту амілази та вплив на неї мобілізованої форми інгібітору. Визначення зв'язків при отриманні біокомплексу за допомогою ІЧ-спектроскопії та характеру кінетики інгібування лінеаризації рівняння Міхаеліса-Ментен по Лайнуівер-Берку і Хейнс. **Результати дослідження.** За допомогою ІЧ-спектроскопії показали, що зшивка інгібітору амілази з біоматрицею відбувається шляхом утворення внутрішньомолекулярних ковалентних зв'язків, електростатичної взаємодії між зарядженими групами гідролізату колагену та інгібітора амілази. Диференціальна крива порівняння ВВОП характеризується зменшенням інтенсивності поглинання іммобілізованого інгібітору в області 3400 см^{-1} , що відповідає валентним коливанням вільної групи -ОН, що свідчить про посилення водневих зв'язків іммобілізованого зразка. Кінетичні параметри інгібування амілази проводили методами лінеаризації рівняння Міхаеліса-Ментен по Лайнуівер-Берку і Хейнсу. Вивчення кінетики інгібування амілази іммобілізованою формою інгібітора показали зменшення ферментативної активності, що характеризується відсутністю змін K_m при зменшенні значення V_{max} , що дозволяє віднести інгібування до лінійного неконкурентного типу. **Сфера застосування результатів.** Біотехнологія отримання біокомплексів, здатних регулювати процеси харчування.

Ключові слова: інгібітор панкреатичної амілази, кінетика гідролізу, кінетичні параметри інгібування панкреатичної амілази

STUDY OF KINETIC PARAMETERS OF HYDROLYSIS BY THE AMYLASE INHIBITOR-COLLAGEN HYDROLYZATE BIOCOMPLEX

Nadiia Dzyuba, PhD, Engineering, Associate Professor
of the Department of Restaurant and Health Food Technology
<https://orcid.org/0000-0001-6609-3965>
Odessa National Technological University, Odessa, Ukraine

Subject. Enzymes and inhibitors are unstable to the action of external factors (temperature, pH), therefore the question of their stabilization by immobilization on biomatrices arises. The study of immobilization using IR spectroscopy allows us to speak more accurately about the process of interaction of enzyme inhibitor and biomatrix. **Purpose.** Study of the kinetic characteristics of a biocomplex based on pancreatic amylase inhibitor and collagen hydrolyzate. **Methods.** Determination of amylase enzyme activity and the influence of the immobilized form of the inhibitor on it. Determination of bonds when obtaining a biocomplex using IR spectroscopy and the nature of the inhibition kinetics of linearization of the Michaelis-Menten equation according to Lineiver-Burke and Haynes. **Results.** Using IR spectroscopy, it was shown that the crosslinking of the amylase inhibitor with the biomatrix occurs through the formation of intramolecular covalent bonds, electrostatic interaction between the charged groups of collagen hydrolysate and amylase inhibitor. The differential comparison curve of the VVOP is characterized by a decrease in the absorption intensity of the immobilized inhibitor in the region of 3400 cm^{-1} , which corresponds to the valence vibrations of the free -OH group, which indicates the strengthening of hydrogen bonds of the immobilized sample. Kinetic parameters of amylase inhibition were performed using the linearization methods of the Michaelis-Menten equation according to Lineiver-Burke and Haynes. The study of the kinetics of amylase inhibition by

*the immobilized form of the inhibitor showed a decrease in enzymatic activity, characterized by the absence of changes in K_m with a decrease in the V_{max} value, which allows us to attribute the inhibition to the linear non-competitive type. **Scope of results.** Biotechnology of obtaining biocomplexes capable of regulating nutritional processes.*

Key words: *pancreatic amylase inhibitor, hydrolysis kinetics, kinetic parameters of pancreatic amylase inhibition*

Постановка проблеми. Високий відсоток захворювань ендокринної системи у людей потребує широкого проведення лікувально-профілактичних заходів. Одним із основних напрямків профілактики в розвинених країнах є використання біологічно активних добавок або біокомплексів, що містять ферменти та їх інгібітори.

Сучасна наука відводить інгібіторам важливу роль у функціонуванні основних біохімічних механізмів, які визначають та регулюють фізіологічні стани клітини, її реакції та взаємодію як із сусідніми клітинами, так і факторами навколишнього середовища, а багатогранність фізіологічних дій, які вони проявляють відкриває широкі перспективи створення поліфункціональних біологічно-активних добавок та біокомплексів.

Інгібітори ферментів широко застосовуються в експериментальних дослідженнях у галузі біотехнології, фізіології, цитології, генетики для вивчення механізмів каталітичної дії ферментів, визначення природи функціональних груп білків, для визначення ролі різних ферментативних процесів в обміні речовин. В останні роки інгібітори ферментів знаходять застосування в медицині як лікарські препарати та біологічно активні добавки. Інтерес до інгібіторів амілаз не випадковий і обумовлений насамперед можливістю гальмування процесів гідролітичного розщеплення харчових полісахаридів з метою зниження рівня глюкози в крові при патологіях, що пов'язані з порушенням вуглеводного обміну. Інгібітори амілолітичних ферментів здатні специфічно уповільнювати перебіг реакцій вуглеводного обміну в організмі людини за допомогою каталітичного розриву глікозидних зв'язків у таких субстратах як крохмаль та крохмалоподібні полі- та олігосахариди.

Перевагою інгібіторів амілолітичних ферментів є те, що їм не властива виражена стимулююча дія на секрецію інсуліну та прийом інгібіторів амілази на тлі дієтотерапії не викликає розвитку гіпоглікемії. Інгібітори амілаз проявляють свою дію у просвіті кишківника, тобто мають периферичний механізм дії, не призводячи до виснаження β -клітин підшлункової залози та дегенерації острівців. Інгібітори α -амілаз рослинного походження виконують основні функції підтримки певного рівня активності власних амілаз, а також знижують рівень глюкози в крові. Інгібітори амілолітичних ферментів широко поширені у рослинному світі [1]. Рослинні інгібітори у ряді випадків перевищують за активністю тваринні та мікробні аналоги, мають меншу токсичність, алергізуючий потенціал, містять супутні корисні біологічно активні компоненти полісахаридної, ліпідної, пігментної та іншої природи. Значним вмістом інгібіторів амілолітичних ферментів характеризуються зернові культури [2, 3]. Однак інгібітори мають невисокі показники рН та термостабільності, що значно погіршує їхню функціональну дію в організмі людини. Тому для їх стабілізації та концентрування застосовують різноманітні методи:

- методи фізичної сорбції на матрицях природного походження;
- методи мікрокапсулювання: комплексоутворення за рахунок електростатичної взаємодії (білків та полісахаридів) або проста коацервація; безмембранний осмос чи складна коацервація;
- для біологічно активних речовин (БАВ) білкової природи можна використовувати також метод осадження в ізоелектричній точці, але недоліком цього є значне зменшення чи повна втрата біологічної активності БАВ.

Метою даного дослідження стало вивчення кінетичної характеристики біокомплексу на основі інгібітору панкреатичної амілази та гідролізату колагена.

Матеріали та методи. В якості біоматриці використовували гідролізат колагену, отриманий шляхом лужної обробки вторинної рибної сировини. [4]

В якості інгібітору амілолітичних ферментів було обрано біологічно активну добавку Irwin Naturals, Carb Blocker, яка містить суміш сухих екстрактів квасолі білої, насіння льна, сухий екстракт касії та сухий екстракт чорного перцю та імбиря.

Процес комплексоутворення біокомпонента з білковою матрицею відбувається, в основному, за рахунок електростатичної взаємодії між зарядженими групами гідролізату колагену та білка (інгібітора) та водневими зв'язками, вище ізоелектричної точки комплексоутворення – за рахунок водневих зв'язків та слабких гідрофобних взаємодій.

ІЧ-спектр інгібітору характеризується наявністю характерної смуги поглинання 1172 см^{-1} , обумовленої скелетними коливаннями. Максимум поглинання в ділянці 1614 см^{-1} визначається коливаннями зв'язків у β -конформаціях, а при 2318 см^{-1} – симетричними коливаннями метильних груп. Поглинання в області 3310 см^{-1} з'являється внаслідок аміногруп коливань, асоційованих водневими зв'язками, а окремий пік при 3428 см^{-1} свідчить про коливання вільних аміногруп. Смуги поглинання в області $2820\text{--}2980\text{ см}^{-1}$ характеризують валентні коливання $-\text{CH}$ та $-\text{CH}_2$ груп. У спектрі іммобілізованого зразка інгібітора спостерігається інтенсивна широка смуга з максимумом поглинання при 3400 см^{-1} , яка зміщена в низькочастотну ділянку в порівнянні з частотою вільних груп, що свідчить про участь гідроксилів у системі водневих зв'язків. Відсутність смуги поглинання при 3650 см^{-1} показує, що всі гідроксильні групи включені у водневий зв'язок.

Диференціальний ІЧ-спектр порівняння характеризується інтенсивним поглинанням в області $662\text{--}1235\text{ см}^{-1}$ для вільного інгібітора, що обумовлено присутністю аміногруп у білковій молекулі. Зменшення величини відносної оптичної щільності (ВВОП) для іммобілізованих зразків у цій області може пояснюватися екрануючим ефектом матриці. Диференціальна крива порівняння ВВОП зразка характеризується зменшенням інтенсивності поглинання іммобілізованого інгібітору в області 3415 см^{-1} , що відповідає валентним коливанням вільної групи $-\text{OH}$, що свідчить про посилення водневих зв'язків іммобілізованого зразка.

Диференціальний ІЧ-спектр порівняння іммобілізованого препарату інгібітора і матриці також характеризується більш високим значенням ВВОП області поглинання водневого зв'язку (3000 см^{-1}), що може пояснюватися утворенням водневих зв'язків між інгібітором і матрицею. Значне поглинання в області $1235\text{--}1270\text{ см}^{-1}$ для гідролізату колагену свідчить про наявність сульфогрупи в ньому. Порівняння ВВОП смуги поглинання карбонільних груп ($1645\text{--}1680\text{ см}^{-1}$) свідчить про екранування поглинання цієї групи внаслідок іммобілізації інгібітору на гідролізаті колагену.

Спостерігається підвищення відносної інтенсивності поглинання (до 54%) диференціального спектру білка за системою інгібітор-гідролізат колагену в системі N-гідролізат колагену в системі 1642 см^{-1} (Амід II) диференціального спектру.

Інгібіторну активність (ІА) визначали за ступенем гальмування ферментативної активності α -амілази тваринного походження та виражали в інгібіторних одиницях (ІЕ).

Активність панкреатичної амілази виражали кількістю крохмалю, розщепленого 1 г ферменту за 1 хвилину. Активність амілази визначали за такою методикою: пробірку, що містить 5 мл розчину ферменту або 2–10 мг іммобілізованого препарату в 5 см^3 води, через 5 хв інкубації при 37°C додавали 10 см^3 1%-го розчину крохмалю в 0,5 н ацетатному буфері рН 4,7. Контрольним розчином виступав 10 см^3 1%-го розчин крохмалю в 5 см^3 води. Через 10 хв інкубації з крохмалем з суміші, що інкубується, відбирали $0,5\text{ см}^3$ і вносили в розчин йоду, об'ємом 50 см^3 (0,0025%-ний розчин йоду).

Оптичну щільність контрольного та дослідного розчинів вимірювали при 590 нм. Амілолітичну активність розраховували за формулою (1):

$$AA = \frac{(D_k - D_o) \cdot 100}{D_k \cdot 10 \cdot n} \quad (1)$$

де D_k – оптична щільність контрольно-розчину, D_o – оптична щільність дослідного розчину, 100 – кількість крохмалю, взяте для випробування як субстрат, мг, 10 – час інкубації, n – наважка препарату, р.

Для дослідження механізму пригнічення амілази було проведено 10 серій дослідів. У 1-ій серії дослідів визначали амілолітичну активність панкреатичної амілази. У наступних серіях дослідів визначення активності амілази здійснювали за зміни кількості інгібітору амілази 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,1; 1,3; 1,5; 1,7; 1,9 г/дм³ (сухих речовин). Концентрація панкреатичної амілази становила 0,01%. До складу реакційної суміші для визначення кінетичних параметрів процесу інгібування панкреатичної амілази входили розчини панкреатичної амілази, її інгібітора та 0,1% розчин крохмалю.

Отримані дані проаналізовані методами лінеаризації рівняння Міхаеліса-Ментен по Лайнуівер-Берку і Хейнс [5, 6]. Значення константи інгібування (K_i) обчислювали методами Діксона та Вебба [5, 6].

Графік Вебба дозволяє провести статистичну оцінку одержаних параметрів, оскільки в ході розрахунків визначається не тільки $tga = K_i$, але його середнє квадратичне відхилення (S_a). Те саме стосується й оцінки початкової швидкості реакції, оскільки відсікання на осі

ординат відрізок («b») дорівнює одиниці, оскільки вираз $\frac{V_0}{V_0 - V_i}$ при насиченні ферменту

інгібітором, тобто при $V_i \rightarrow 0$ в умовах $[I] \rightarrow \infty$ і, відповідно $\frac{1}{[I]} \rightarrow 0$ перетворюється на $\frac{V_0}{V_0}$, А

"Sb" є його середнім квадратичним відхиленням. Крім того, виходячи з графіка Вебба, можна констатувати, наскільки узгоджуються між собою отримані значення константи інгібування, оскільки $C = -K_i$.

Результати та обговорення.

Щільність та міцність сітки водневих зв'язків досліджували за допомогою характеристичної смуги поглинання 3400 см⁻¹, яка відповідає валентним коливанням -ОН груп. Для цього визначали напівширину смуги за хвильовими числами досліджуваної ділянки спектра, відносну інтенсивність смуги за значенням ВВОП (табл. 1).

Таблиця 1
Характеристика водневих зв'язків

Зразок	ВВОП смуги 3400 см ⁻¹	Напівширина смуги, см ⁻¹
Інгібітор	1,25	405
Гідролізат колагену	1,32	678
Біокомплекс	1,51	655

З даних, наведених у табл. 1, видно, що при порівнянні зразків гідролізату колагену та біокомплексу відзначається зменшення напівширини смуги поглинання, що відповідає валентним коливанням – ОН груп. Це свідчить про збільшення кількості -ОН груп, що у міцних

водневих зв'язках.

Таким чином, результати досліджень свідчать, що при іммобілізації інгібітора на гідролізаті колагену утворюються водневі зв'язки між інгібітором та матрицею, що дає змогу подальшого використання отриманого біокомплексу в якості біологічно-активного компонента в функціональному харчуванні.

Кількісна оцінка реакційної здатності інгібітора, тобто визначення кінетичних параметрів реакції є обов'язковим елементом ферментативного аналізу. Кінетична характеристика реакцій пригнічення ферментів базується на уявленнях про механізм взаємодії інгібіторів з ферментами [7–9].

За результатами кінетичних досліджень визначають оптимальні умови процесу, судять про ступінь спорідненості субстрату та інгібітора до ферменту, роблять висновки про природу ферментативного процесу тощо. Участь у механізмах ферментативних реакцій

проміжних сполук $E + S \xrightarrow{K_m} ES \xrightarrow{K_{cat}} E + P$ призводить до наступної залежності стаціонарної швидкості реакції від концентрації субстрату (рівняння Міхаеліса):

$$v = \frac{-dS}{dt} = -d \left[S = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \right], \quad (2)$$

де $V_{\max}$ і K_m здебільшого мають ефективне значення, оскільки включають константи швидкостей елементарних хімічних актів багатадійного ферментативного процесу.

Проведені розрахунки за Лайнуївером-Берком та Хейнсом свідчать про лінійний тип експериментальної залежності, що підтверджується високими коефіцієнтами лінійної кореляції.

У діапазоні концентрацій інгібітору 50 мг...3,2 г/дм³ спостерігається зниження $V_{\max}$ у міру зростання концентрації інгібітору без істотних змін значень K_m порівняно з інтактним ферментом (без інгібітора панкреатичної амілази).

Значення K_m залишається приблизно постійним по всьому діапазону концентрацій біокомплексу, воно приблизно в 1,45...1,62 рази менше, ніж у випадках як інтактного ферменту, так і неконкурентного інгібування інгібітором.

Порівняння отриманих результатів кінетичних досліджень інгібітора та біокомплексу виявило зростання K_m для біокомплексу, порівняно з інгібітором. Відмінності між цими значеннями, обчисленими з використанням даних графіка Лайнуївера-Берка (рис. 1), статистично недостовірними внаслідок великого розкиду даних, для даних отриманих за Хейнсом (рис. 2), вже спостерігається достовірність відмінностей (для $1990,1-424,4 = 1565,7$ значення «t» становить $3,487, 0,08 < 0,01$, для $678,4-445 = 233,3$ отримали $t = 3,391$, що за $n = 11$ також дає $0,002 < p < 0,01$); відмінності достовірні і за порівняння даних, отриманих методом Уебба (для $1360,4-403,8 = 956,6$ маємо $t = 7,844$, що з $n = 48$ дає $p < 0,001$).

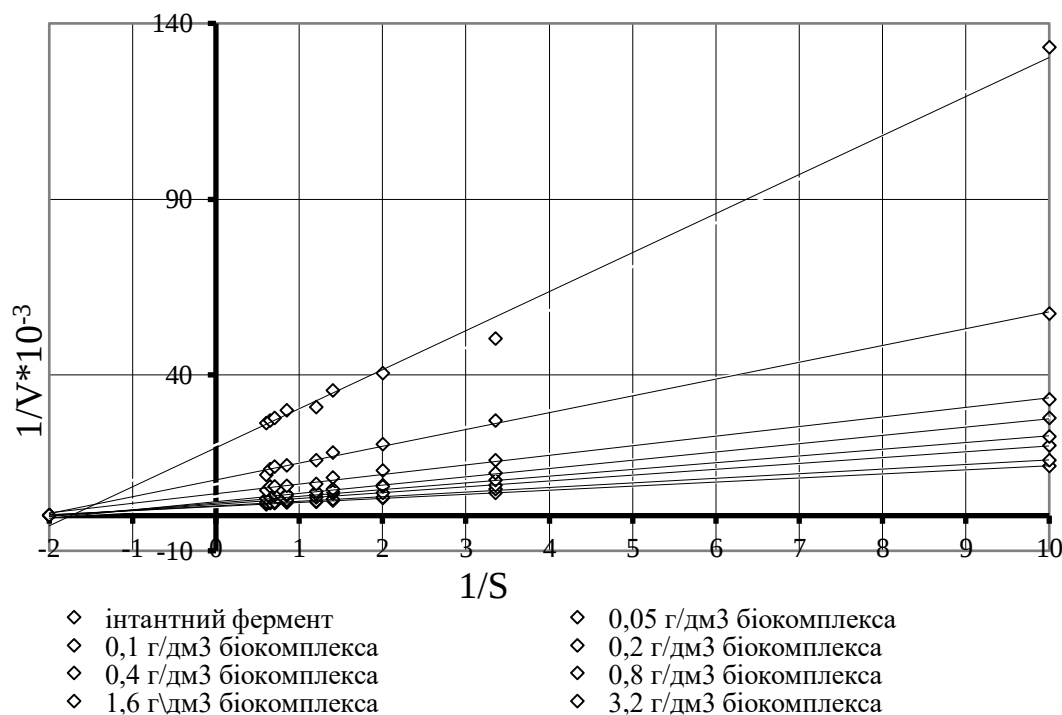


Рис. 1. Графік інгібування за Лайнуївером-Берком

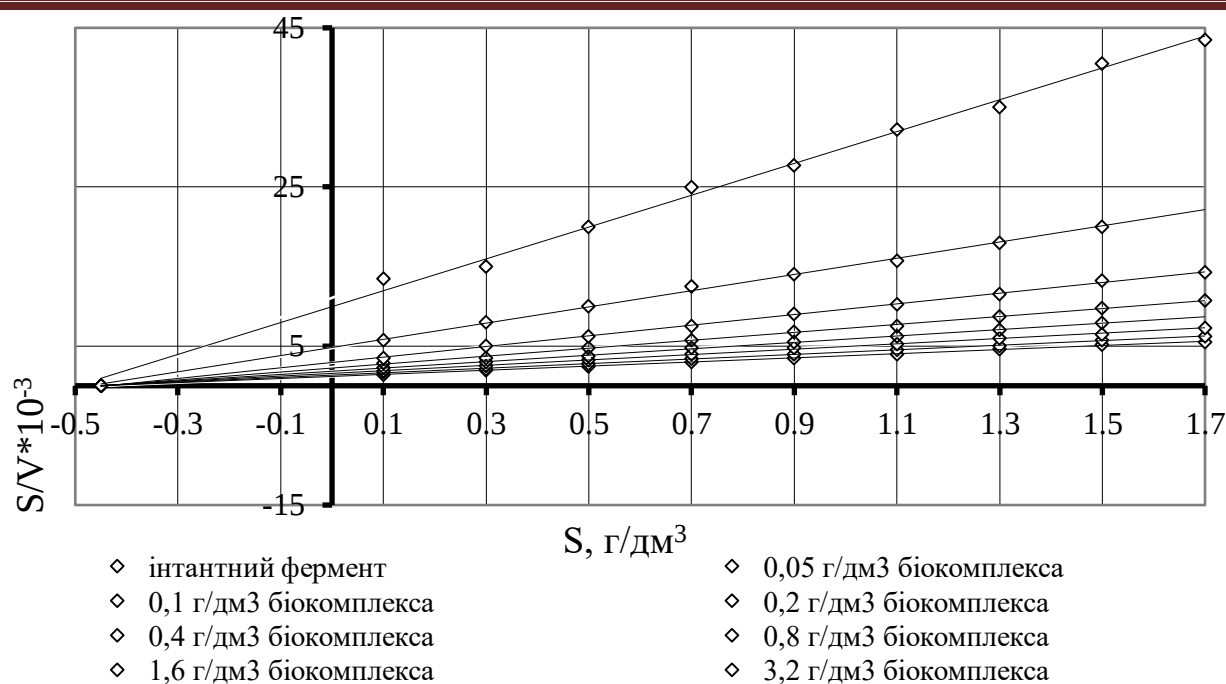


Рис. 2. Графік інгібування за Хейнсом

Зменшення константи Міхаеліса розглядається як підвищення взаємодії ферменту та субстрату (стабілізація фермент-субстратного комплексу). Таким чином, результати обробки даних експерименту з інгібуванням панкреатичного амілази біокомплексом з використанням методів математичного аналізу кінетичних досліджень показали відсутність змін при значеннях $V_{\max}$, які зменшуються, що дозволяє віднести інгібування до лінійного неконкурентного типу (каталітичне інгібування).

Зменшення ферментативної активності, що характеризується відсутністю змін K_m зменшуються значеннях $V_{\max}$ дозволяє віднести інгібування до неконкурентного типу (каталітичне інгібування). У цьому випадку цілком правомірно використовувати графіки Діксона та Вебба для визначення значення константи інгібування. Вихідні значення побудови графіка Диксона (рис. 3) та Уебба (рис. 4) представлені в табл. 2.

Таблиця 2

Кінетичні параметри реакції гідролізу крохмалю панкреатичною амілазою у присутності інгібітору

№ з/п	[I], г/дм ³	1/V _{max}	
		За даними графіка Лайнуівера-Берка (значення b)	За даними графіка Хейнса (значення a)
1	0	$2,568 \cdot 10^{-3}$	$2,579 \cdot 10^{-3}$
2	$5 \cdot 10^{-2}$	$2,877 \cdot 10^{-3}$	$2,865 \cdot 10^{-3}$
3	$1 \cdot 10^{-2}$	$3,199 \cdot 10^{-3}$	$3,317 \cdot 10^{-3}$
4	$2 \cdot 10^{-2}$	$3,976 \cdot 10^{-3}$	$4,025 \cdot 10^{-3}$
5	$4 \cdot 10^{-2}$	$4,635 \cdot 10^{-3}$	$4,930 \cdot 10^{-3}$
6	$8 \cdot 10^{-2}$	$6,938 \cdot 10^{-3}$	$6,787 \cdot 10^{-3}$
7	1,6	$1,040 \cdot 10^{-3}$	$1,004 \cdot 10^{-3}$
8	3,2	$1,819 \cdot 10^{-3}$	$1,978 \cdot 10^{-3}$

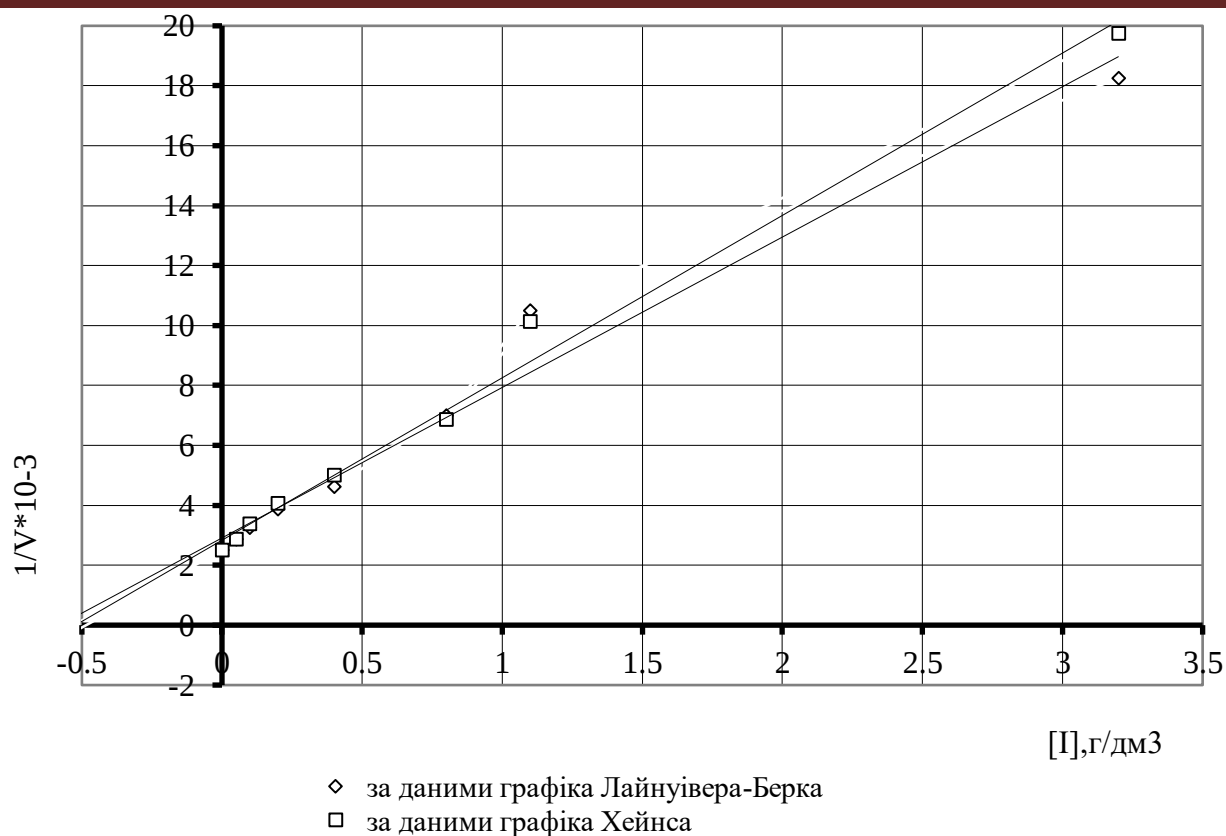


Рис. 3. Графік інгібування за Диксоном

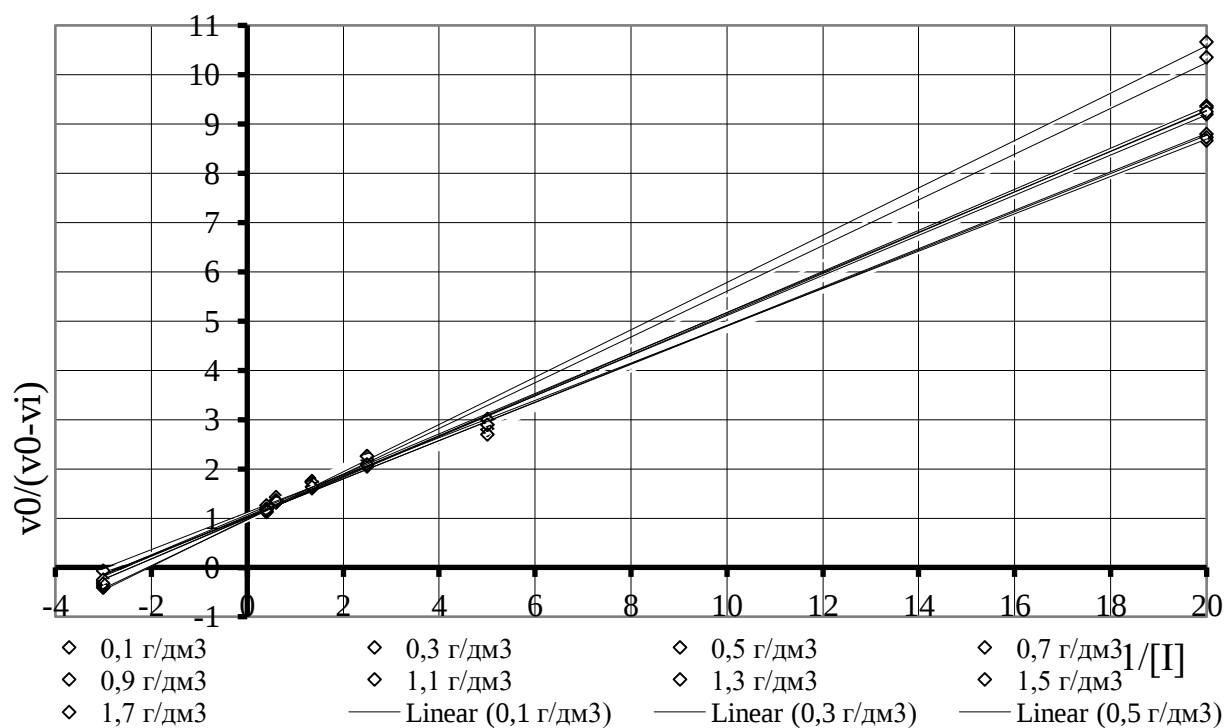


Рис. 4. Графік інгібування за Уеббом

Побудований згідно з цими вихідними даними графік Диксона характеризувався параметрами, наведеними в табл. 3.

Таблиця 3

Статистичні та кінетичні параметри реакції гідролізу крохмалю панкреатичною амілазою у присутності інгібітора, розраховані з графіка Диксона

За даними графіка Лайнуівера-Берка	За даними графіка Хейнса
$a = 4,8316 \cdot 10^{-3}$	$a = 5,2126 \cdot 10^{-3}$
$b = 2,7647 \cdot 10^{-3}$	$b = 2,6516 \cdot 10^{-3}$
$z = -5,7222 \cdot 10^{-1}$	$z = -5,0871 \cdot 10^{-1}$
$S_a = \pm 6,5853 \cdot 10^{-5}$	$S_a = \pm 1,5708 \cdot 10^{-4}$
$S_b = \pm 8,6029 \cdot 10^{-5}$	$S_b = \pm 2,0521 \cdot 10^{-4}$
$r = 9,9944 \cdot 10^{-1}$	$r = 9,9729 \cdot 10^{-1}$
$n = 8$	$n = 8$
$K_i = 5,7221 \cdot 10^{-1} \text{ г/дм}^3$	$K_i = 5,0870 \cdot 10^{-1} \text{ г/дм}^3$
$V_{\max} = 361,7216 \text{ АЕ/мг}$	$V_{\max} = 377,1098 \text{ АЕ/мг}$

Згідно з Келеті, розрахункова формула має такий вигляд:

$$K_i = \frac{\text{tg} \alpha \cdot I}{\text{tg} \alpha' - \text{tg} \alpha} = \frac{\Delta Y \cdot I}{\Delta Y' - \Delta Y}, \quad (3)$$

Де знак «'» відноситься до відповідного показника реакції інгібування.

З урахуванням фізичного змісту представлених параметрів проведено такі перетворення стосовно графіка Хейнса:

$$K_i = \frac{\Delta Y \cdot I}{\Delta Y' - \Delta Y} = \frac{\text{tg} \alpha \cdot I}{\text{tg} \alpha - \text{tg} \alpha'} \quad (4)$$

При розрахунках K_m інгібованого ферменту по Хейнсу (рис. 2) та Лайнуіверу-Берку (рис. 1) при концентрації інгібітору $1,6 \text{ г/дм}^3$ використовували 7 крапок, це враховується при розрахунку середнього квадратичного відхилення, а також середньої стандартної помилки. Результати визначення статистичних постійних представлені у табл. 4.

Таким чином, значення K_m за Лайнуівер-Берком для ферменту в присутності інгібітора $K_m = 486,8 \pm 9,1 \text{ мг/дм}^3$, а за Хейнсом $K_m = 463,7 \pm 4,6 \text{ мг/дм}^3$.

Аналіз даних за графіком Уебба (рис. 3) представлений у табл. 5.

Таблиця 4

Статистичні постійні розрахунку кінетичних параметрів по Лайнуіверу-Берку та Хейнсу

Лайнуівером-Берком	За Хейнсом
$\bar{X} = 4,8677 \cdot 10^{-1}$	$\bar{X} = 4,63669 \cdot 10^{-1}$
$G\bar{X} = \pm 7,1463 \cdot 10^{-2}$	$G\bar{X} = \pm 3,6471 \cdot 10^{-2}$
$S\bar{X} = \pm 9,0758 \cdot 10^{-3}$	$S\bar{X} = \pm 4,6318 \cdot 10^{-3}$
$t = 53,6333$	$t = 100,1053$
$p < 0,001$	$p < 0,001$
$n = 7$	$n = 7$

Таблиця 5

Статистичні постійні розрахунки K_i і $V_{\max}$ за графіком Вебба

Для K_i	Для $V_{\max}$
$\bar{X} = 4,0377 \cdot 10^{-1}$	$\bar{X} = 9,2006 \cdot 10^{-1}$
$G\bar{X} = \pm 2,6708 \cdot 10^{-2}$	$G\bar{X} = \pm 2,3464 \cdot 10^{-1}$
$S\bar{X} = \pm 3,3919 \cdot 10^{-3}$	$S\bar{X} = \pm 2,9799 \cdot 10^{-2}$
$t = 119,0391$	$t = 30,8754$
$p < 0,001$	$p < 0,001$
$n = 9$	$n = 9$

Таблиця 6

Статистичні постійні обробки результатів гідролізу крохмалю в присутності інгібітору амілази методами Лайнуівера-Берка та Хейнса

Для графіка Лайнуівера-Берка	
По tg (Km/Vmax)	За ΔУ (1/Vmax)
$\bar{X} = 4,1921 \cdot 10^{-1}$	$\bar{X} = 4,5772 \cdot 10^{-1}$
$G\bar{X} = \pm 1,2919 \cdot 10^{-1}$	$G\bar{X} = \pm 6,2762 \cdot 10^{-2}$
$S\bar{X} = \pm 4,8833 \cdot 10^{-2}$	$S\bar{X} = \pm 2,3722 \cdot 10^{-2}$
$t = 8,5845$	$t = 19,2953$
$p < 0,001$	$p < 0,001$
$n = 7$	$n = 7$
Для графіка Хейнса	
За ΔУ (Km/Vmax)	По tg α (1/Vmax)
$\bar{X} = 4,2436 \cdot 10^{-1}$	$\bar{X} = 4,4498 \cdot 10^{-1}$
$G\bar{X} = \pm 1,0203 \cdot 10^{-1}$	$G\bar{X} = \pm 7,3228 \cdot 10^{-2}$
$S\bar{X} = \pm 3,8563 \cdot 10^{-2}$	$S\bar{X} = \pm 2,7678 \cdot 10^{-2}$
$t = 11,0044$	$t = 16,0773$
$p < 0,001$	$p < 0,001$
$n = 7$	$n = 7$

Таким чином, згідно з графіком Вебба, $K_i = 403,8 \pm 3,4$ мг/дм³. Цей метод призводить до занижених значень максимальної швидкості неінгібованого ферменту, що становить $(92 \pm 3)\%$ теоретичного значення. Дані обробки результатів розрахунків за графіками Лайнуівера-Берка та Хейнса представлені в табл. 6.

Як видно з наведених даних, розрахунки по $K_m/V_{\max}$ дають менші абсолютні значення K_i , ніж розрахунки по $1/V_{\max}$. Разом про те, враховуючи помилки визначення цих значень, результати є, сутнісно, однаковими. Отримані результати аналізу об'єднані у таблиці 7.

Таблиця 7

Кінетичні параметри реакції гідролізу крохмалю панкреатичною амілазою у присутності інгібітора з борошна вівса

Визначається параметр	Графік Лайнуівера-Берка $X \pm m$ $n = 7$	Графік Хейнса $X \pm m$ $n = 7$	Обчислювальний метод $X \pm m$; $n = 7$				Графік Діксона		Графік Вебба $X \pm m$ $n = 9$
			За даними графіка Лайнуівера-Берка		За даними графіка Хейнса		$\frac{1}{V_{\max}}$	$\frac{1}{V_{\max}}$	
			$\frac{\text{tg } \alpha}{K_m}$	$\frac{\Delta Y}{1}$	$\frac{\Delta Y}{K_m}$	$\frac{\text{tg } \alpha}{1}$	за графіком Лайнуівера-Берка	за графіком Хейнса	
Константа Міхаеліса (а)	486,8 ± 9,1 (с)	463,7 ± 4,6 (с)	-	-	-	-	-	-	-
Максимальна швидкість реакції (в)	-	-	-	-	-	-	361,7	377,1	92 ± 3 (d)
Константа інгібування (а)	-	-	419,2 ± 48,8	457,7 ± 23,7	424,4 ± 38,6	445,0 ± 27,7	572,2	508,7	403,8 ± 3,4

а – мг/дм³; в – АЕ/мг; відповідає $V_{\max}$ інтактного ферменту; с – Відмінності статистично достовірні, $t = 2,267$; $0,02 < p < 0,05$; d – у разі результати представлені у відсотках. Скрізь, крім ситуації "с", $p < 0,001$.

Оскільки використання іммобілізованих препаратів інгібіторів (так само, як і ферментів) відноситься до області гетерогенних процесів (інгібування або каталізу, відповідно), причинами зростання K_i можуть бути:

- дифузійні утруднення; з урахуванням того, що молекулярна маса інгібітору дорівнює 25,1 кДа, а гідролізату колагена – на декілька порядків вище, тому зв'язування білка з таким носієм повинно призводити до дифузійних утруднень;

- стеричні (просторові) обмеження; знову ж за рахунок різкого зростання молекулярної маси (розмірів) продукту взаємодії інгібітору з агаром, його зв'язування з α -амілазою може ускладнюватися.

Крім того, необхідно враховувати і такі можливості:

- конформаційні зміни молекули інгібітору, як результат його ковалентної іммобілізації на агарі; вони можуть впливати на зв'язування інгібітору з ферментом;

- електростатичний ефект сульфогруп агаропектину;

- вплив цих же груп на рН в мікрооточенні інгібітору і (або) ферменту, що змінює швидкість і міцність їх взаємодії.

Не виключено, що електростатичні і рН-ефекти можуть позначатись на зниженні швидкості ферментативної реакції, хоча таке зниження незначне, и може лежати в межах точності експерименту

Висновки. Таким чином, результати обробки даних експерименту з інгібування панкреатичної амілази іммобілізованим інгібітором з використанням наведених вище методів математичного аналізу кінетичних досліджень дозволяють стверджувати, що має місце лінійне неконкурентне інгібування ферменту.

Бібліографія

1. Кабачний П. І. Перспективи створення лікарських засобів гіпоглікемічної дії на основі природних інгібіторів амілолітичних ферментів: Лікарські засоби. Економіка, технологія та перспективи отримання. Огляд. М.: ВНИИСЕНТИ Мінмедпрому СРСР, 1990. Вип.1. 23 с.

2. Крусір Г. В., Кушнір Н. А. Поширеність інгібіторів амілаз у зернових. Зернові продукти і комбікорми. 2008. № 4. С. 15–20.

3. Ulrik Sidenius, Karsten Oisen, Birte Svensson, Ulla Christensen. FEBSLetters. 1995. V. 361. P. 250–254.

4. Пат. № 79357 Україна, МПК (2013) A23 J 1/04. Спосіб одержання колагенового препарату. Н.А.Кушнір, Л.М. Тележенко; заявник і патентовласник Одеська національна академія харчових технологій. № u201209751; заявл. 13.08.2012; опубл. 25.04.2013. Бюл. № 8/2013.

5. Perrin D. D., Armarego W. L. F., Dawn R. Perrin Purification of Laboratory chemicals. Pergamon Press-Oxford, 1966. 181 p.

6. Мари Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: у 2-х томах (пер. с англ.). М.: Мир, 1993. 384 с.

7. Наконечна О. А., Бачинський Р. О. Біохімія ферментів. Аспекти медичної ензимології: навч.-метод. посібник для підготовки до практ. занять з біологічної хімії (для студентів медичних та стоматологічного факультетів). Харків: ХНМУ, 2020. 48с.

8. Огурцов А. Н. Кинетика ферментативных реакций: учеб. пособие по курсу «Ферментативный катализ» для студ. спец. 092901 «Промышленная биотехнология». Харьков: НТУ «ХПИ», 2007. 146 с.

9. Дзюба Н. А. Особливості іммобілізації α -амілази на білкових та полісахаридних матрицях. Вісник Національного технічного університету «ХПІ». Збірник наукових праць. Серія: Механіко-технологічні системи та комплекси. 2015. № 52 (1161). С. 108–112.

References

1. Kabachnyi, P. I. (1990). Perspektivy stvorennia likarskykh zasobiv hipohlikemichnoi dii na osnovi pryrodnykh inhibitoriv amilolitychnykh fermentiv: Likarski zasoby. Ekonomika, tekhnolohiia ta perspektivy otrymannia. Ohliad. [Prospects for the creation of hypoglycemic drugs based on natural inhibitors of amylolytic enzymes: Drugs. Economics, technology and prospects for obtaining. Review]. M.: VNYISENTY Minmedpromu SRSR [Ministry of Medical Industry of the USSR]. SRSR, V. 1. 23 p. [in Ukrainian].

2. Krusir H. V., Kushnir N. A. (2008). Poshyrenist inhibitoriv amilaz u zernovykh. [Prevalence of amylase inhibitors in cereals]. Zernovi produkty i kombikormy [Grain products and compound feeds]. № 4. P. 15–20. [in Ukrainian].

3. Ulrik Sidenius, Karsten Oisen, Birte Svensson, Ulla Christensen (1995). FEBSLETTERS. V. 361. P. 250–254.
4. Kushnir, N. A., Telezhenko, L. M. Patent № 79357 Ukraina, MPK (2013) A23J1/04. Sposib oderzhannia kolahenovoho preparatu. [Method of obtaining a collagen preparation]; Applicant and Patent Attorney Odeska natsionalna akademiia kharchovykh tekhnolohii. № u201209751; stated. 13.08.2012. Bjul. 25.04.2013.8/2013 [in Ukrainian].
5. Perrin, D. D., Armarego, W. L. F., Dawn R. Perrin (1966). Purification of laboratory chemicals. Pergamon Press-Oxford, 181 p. [in English].
6. Mari, R., Grenner, D., Meies, P., Roduell V. (1993). Biokhimiya cheloveka: u 2-kh tomakh (per. z english). M.: Mir, 384 p. [in russian].
7. Nakonechna, O. A., Bachynskyi, R. O. (2020). Biokhimiia fermentiv. Aspekty medychnoi enzymolohii: navch.-metod. posibnyk dlia pidhotovky do prakt. zaniat z biolohichnoi khimii (dlia studentiv medychnykh ta stomatolohichnoho fakultetiv) [Biochemistry of enzymes. Aspects of medical enzymology: a teaching and methodological manual for preparing for practical classes in biological chemistry (for students of medical and dental faculties)]. Kharkiv. KhNMU, 48 p. [in Ukrainian].
8. Ohurtsov, A. N. (2007). Kynetyka fermentatyvnykh reaktsyi: ucheb. posobye po kursu «Fermentativnyi katalyz» dlia stud. spets. 092901 «Promishlennaia byotekhnolohiia». [Kinetics of enzymatic reactions: учеб. manual for the course «Fermentative catalysis» for students. special 092901 "Industrial biotechnology"]. Kharkiv. NTU «KhPI», 146 p. [in Ukrainian].
9. Dzyuba, N. A. (2015). Osoblyvosti immobilizatsii α -amilazy na bilkovykh ta polisakharydnykh matrytsiakh [Features of α -amylase immobilization on protein and polysaccharide matrices]. Visnyk Natsionalnoho tekhnichnoho universytetu «KhPI». Zbirnyk naukovykh prats. Seriia: Mekhaniko-tekhnolohichni systemy ta komplekсы [Bulletin of the National Technical University «KhPI». Collection of scientific papers. Series: Mechanical and technological systems and complexes]. № 52 (1161). P. 108–112. [in Ukrainian].