

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ АЛКИЛРЕЗОРЦИНОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТНЫХ БЕЛКОВ В БИОТЕХНОЛОГИЯХ

Ю.И. Матвеев¹, Е.В. Аверьянова²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля» РАН, г. Москва

²Бийский технологический институт (филиал) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», г. Бийск.

Выявлены причины осцилляции ферментативной активности лизоцима при добавлении в раствор 5-метилрезорцина: с одной стороны 5-метилрезорцин изменяет энергию активации распада межатомных связей в субстрате, а с другой стороны происходит его пластификация. Показано, что биологический максимум активности лизоцима в 1,34 раза меньше химического. Соответствующая ему концентрация 5-метилрезорцина равна 34 мг/л. Полученные результаты могут быть использованы для анализа вклада гомологов алкилрезорцинов в медицине и биотехнологиях.

Ключевые слова: лизоцим, 5-метилрезорцин, субстрат, механизмы активации фермента

ВВЕДЕНИЕ

Лизоцим или мурамидаза (КФ 3.2.1.17) – биополимер, который, обладая антибактериальным действием, широко используется в пищевых технологиях и медицине для защиты биологических объектов от действия вредных бактерий. В пищевой промышленности лизоцим применяется в качестве консерванта (пищевая добавка E1105), при производстве сыра и некоторых других молочнокислых продуктов, в фармацевтике – как компонент многих препаратов для лечения и профилактики разнообразных инфекций, в косметике – как эффективная антимикробная и противовоспалительная добавка.

Для усиления действия лизоцима используют разные химические вещества, в том числе, ароматические спирты – 5-метилрезорцин (МР), гексилрезорцин и другие.

Исследования влияния концентрации МР C_{MR} на активность лизоцима, выполненные в работе [1], показали, что она достигает максимума – 183 % от контрольного уровня при $C_{MR} = 6.8$ мМ или числе молекул МР, приходящихся на молекулу лизоцима, $R = 100$. В дальнейшем этот максимум мы будем называть чисто химическим или технологическим, который широко используется в ряде пищевых технологических процессов.

Кроме того, зависимость активности системы лизоцим-МР-хитин от концентрации МР при $C_{MR} < 6.8$ имеет осциллирующий характер [2]. Найденный при этом первый максимум активности фермента при $C_{MR} = 0.68$ мМ мы будем называть биологическим, который в 1.34 раза меньше максимума химического, а соответствующая ему концентрация является верхней

границей безопасного потребления продуктов пищевой промышленности.

Реально C_{MR} в конечном продукте должна быть еще меньше и будет определяться предельно-допустимой концентрацией (ПДК). В случае МР, который является ядовитым веществом (справочник *Fluka*), его ПДК = 1 мг/л в питьевой воде [3].

В настоящее время толкование роли алкилрезорцинов в продуктах питания не однозначно. Как правило, в пищевые вещества (ржаная мука, масло орехов кешью и т.д.) алкилрезорцины входят в виде смеси гомологов, различающиеся длиной и расположением гидрофобного алкильного радикала. Поэтому выявление влияния длины алкильных радикалов на активность ферментов, роли промежуточных максимумов активности в пищевых технологиях представляется очень важным.

Ранее алкилрезорцины рассматривались как физиологически нежелательные вещества для организма человека. Поэтому селекция ржи была направлена на выведение сортов с низким содержанием этих веществ. В настоящее время имеются многочисленные работы, которые позволяют характеризовать алкилрезорцины как нутрицевтики, т.е. как *пищевые продукты, которые обладают лечебными свойствами для профилактики и предупреждения болезней*. По данным некоторых авторов они действуют как антиоксиданты в обмене арахидоновой кислоты. Доказана их антибактериальная активность, выявлено их угнетающее действие на некоторые виды патогенных грибов. 5-алкилрезорцины применяются в качестве медицинских препаратов для профилактики и лечения таких заболеваний как ожирения, злокачественные новообразования

В данной работе на примере действия МР на систему лизоцим-хитин постараемся выявить:

- механизм действия МР на систему лизоцим-хитин;
- причины осцилляции ферментативной активности лизоцима при активации МР.

Выбор в качестве субстрата хитина обусловлен тем, что он входит в состав клеточной стенки бактерий и является доступным для исследований субстратом. В рамках предлагаемого подхода не представляет никакой сложности перейти к другим видам субстратов. На основании разработанной математической модели будут проанализированы ферментативные процессы, имеющие место в пищевых технологиях.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРОВ КЛЕФТА И КОЛИЧЕСТВА ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ЗВЕНЬЕВ ХИТИНА, ПОПАДАЮЩИХ В НЕГО

В настоящее время структура лизоцима довольно хорошо изучена:

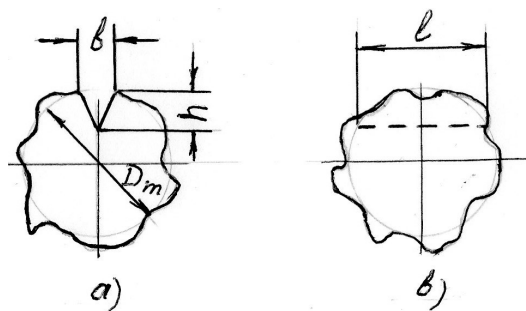
- известна последовательность аминокислотных остатков (а.к.о.) в молекуле лизоцима, и его вторичная структура [4];

- на основании данных рентгеноструктурного анализа (РСА) построена 3D-модель молекулы лизоцима [5], которая позволяет оценить геометрические размеры клефта и идентифицировать петли а.к.о., попадающие внутрь клефта;

- спектроскопия отдельных молекул показала [6], что при взаимодействии лизоцима с хитином образуется связанная система, состоящая из двух осцилляторов, характеризующихся двумя резонансными частотами (15 и 330 Гц), причем продуктивной (определяющей выход продуктов катализа) является низкая частота – 15 Гц;

- известны ряд моделей каталитического действия лизоцима на субстрат [7-11].

Для уточнения процессов, происходящих в клефте, выполним ряд его оценок. Рентгеноструктурный анализ лизоцима позволил воспроизвести геометрический образ молекулы (3D-модель), глубину h и ширину b клефта. На основании данных [5] определим соотношения h/D_m и b/D_m , где D_m – характерный размер лизоцима (рис. 1, а), которые будут соответственно равны $h/D_m = 0.24$, $b/D_m = 0.17$. При среднем размере молекулы лизоцима $D_m = \langle 2R_{Lys} \rangle = 41.5 \text{ \AA}$ ($\langle R_{Lys} \rangle$ – ее гидродинамический радиус) [12], глубина клефта будет $h = 10 \text{ \AA}$, ширина $b = 7 \text{ \AA}$, а длина основания клефта (рис. 1, б) $l = 35.5 \text{ \AA}$. Для оценки объема клефта ΔV_{cl} аппроксимируем его треугольной призмой и по найденным значениям геометрических размеров клефта h , b и l рассчитаем $\Delta V_{cl} = 1242.5 \text{ \AA}^3$.



а) – вид спереди; б) – вид сбоку
пунктиром обозначено дно клефта;
тонкой серой линией – ядро лизоцима

Рис. 1. Схематическое изображение глобулы лизоцима и основных геометрических размеров клефта

Так как в клефт попадают две петли лизоцима (в табл. 1 они выделены жирным шрифтом): первая петля образована 6 а.к.о. (*NFNSQA*) и ее ван-дер-ваальсовый объем $\Delta V_I = 578.7 \text{ \AA}^3$, а вторая петля образована 5 а.к.о. (*NTDGS*) и ее ван-дер-ваальсовый объем $\Delta V_{II} = 394.3 \text{ \AA}^3$, то объем, приходящийся на субстрат (хитин) $\Delta V_{sub} = 269.5 \text{ \AA}^3$.

Табл. 1. Вторичная структура лизоцима

Типы упорядоченных структур	Номера а.к.о. в упорядоченной части	Количество а.к.о. в упорядоченной части	Количество а.к.о. в петлях
α -спирали	<u>5 – 14</u>	10	4(+)
α -спирали	<u>25 – 36</u>	12(C-30, A-31, 32)	10(2+,3-)
β -складки	<u>43 – 45</u>	3	6 (A-42)
β -складки	<u>51 – 53</u>	3	5
β -повороты	<u>54 – 57</u>	4	0
β -повороты	<u>60 – 63</u>	4	2
α -спирали	<u>80 – 84</u>	5	16(C-64, -, 2+)
α -спирали	<u>89 – 101</u>	13	4 (-)
α -спирали	<u>104 – 107</u>	4	2(-)
α -спирали	<u>109 – 114</u>	6	1
β -повороты	<u>115 – 117</u>	3	0
α -спирали	<u>121 – 124</u>	4	3(-)

Примечание: У петель в скобках указано количество положительно и отрицательно заряженных а.к.о., образующих их. При изменении pH заряд опушки будет меняться. Активные центры *Glu-35* и *Asp-52* входят в упорядоченные части. Серым цветом обозначены α -спирали, образующие α -домены, остальные упорядоченные структуры (β -складки, β -повороты и α -спирали) образуют β -домены. Петли, выделенные жирным шрифтом, находятся внутри клефта.

Ван-дер-ваальсовы объемы а.к.о. взяты из [13], а величина $\Delta V_{chit} = 172 \text{ \AA}^3$ из работы [14]. Тогда число повторяющихся звеньев хитина n , попадающих в клефт, будет $n_{chit} = \Delta V_{sub} / \Delta V_{chit} = 1.6$, т. е. округленно $n_{chit} = 2$. Кроме того, в клефт проникают молекулы воды, ван-дер-ваальсовый объем которой значительно меньше объемов а.к.о. и повторяющегося звена субстрата. Таким образом, динамическая модель фермен-

та, рассмотренная в [8], может быть образована а.к.о. петли лизоцима, молекулой воды и хитином.

Согласно [14] введение МР может привести только к пластификации хитина, так как внутри клефта для МР, ван-дер-ваальсовый объем которого $\Delta V_{MP} = 149.4 \text{ \AA}^3$, не хватит места. Причем процесс пластификации хитина будет меняться во времени – по мере увеличения прединкубационного периода наблюдается уменьшение ферментативной активности лизоцима. Так как МР и хитин совместимы (они имеют близкие параметры растворимости), диффузия МР в хитин будет происходить до полного его насыщения.

Таким образом, проведенные исследования позволяют скорректировать модель, предложенную для описания механизма действия фермента в работе [7]. Клефт, даже при самых благоприятных обстоятельствах, не может захватить больше двух повторяющихся звеньев хитина (в [7] их 6). Остальные звенья хитина будут удерживаться а.к.о. петель и поверхности ядра лизоцима, которые находятся вблизи клефта и совместимы с хитином.

УТОЧНЕНИЕ ДИНАМИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ЛИЗОЦИМА И ВЛИЯНИЯ 5-МЕТИЛРЕЗОРЦИНА НА ЕГО ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ

Рассмотрим механизм действия лизоцима на субстрат (хитин). В работе [14] показано, какие а.к.о. фермента совместимы с субстратом и поэтому могут удерживать его. В результате создаются необходимые условия захвата фрагмента субстрата клефтом фермента.

Флуктуации плотности клубка хитина и петель приводят к флуктуации давления в системе (петля фермента) – вода-элемент цепи субстрата и нагнетанию воды в клефт между субстратом и дном клефта из-за выпрямленной диффузии [15], что приводит к возрастанию давления внутри клефта. Локальное воздействие клефта на субстрат способствует перегрузке и разрыву О-гликозидной связи между атомом С-1 и кислородом, связывающим гликозидные циклы.

На процесс разрушения молекулы хитина оказывает влияние и формирование колебательной системы, ускоряющей процесс разрушения ковалентных связей. На рис. 2 представлена динамическая модель воздействия на хитин одной из петель лизоцима и воды на последней стадии разрушения субстрата. При этом предполагается, что вязкость (долговечность) молекулы хитина в месте контакта с водой будет определяться энергетическим барьером, препятствующим разрыву химической связи [16-18].

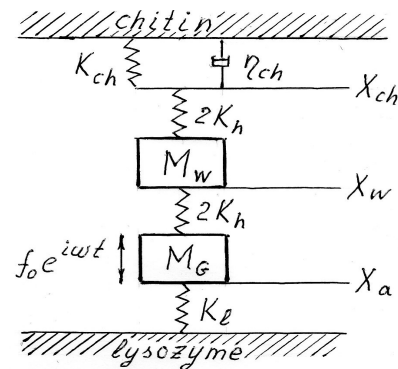


Рис. 2. Динамическая модель воздействия петли лизоцима через водородные связи воды на захваченный участок молекулы хитина

В свете имеющихся экспериментальных данных, уточним некоторые элементы модели [14]. Как показывает спектроскопия (*single-molecule fluorescence resonance energy transfer (smFRET) spectroscopy*) отдельных молекул [6], при взаимодействии активного центра лизоцима с хитином образуется связанная система, состоящая из двух осцилляторов, характеризуемых двумя резонансными частотами (15 и 330 Гц), причем продуктивной (определяющей выход продуктов катализа) является низкая частота – 15 Гц. В нашем случае в качестве элементов таких осцилляторов могут выступать а.к.о. петель лизоцима, находящиеся внутри клефта, которые связаны через воду водородными связями с петлями хитина. Эти петли лизоцима находятся около активных центров *Glu-35* и *Asp-52* (в табл. 1 они обозначены жирными цифрами, на рис. 2 – серым цветом).

Кроме того, можно скорректировать модель из двух осцилляторов, предложенную в работе [14] – рис. 2, где K_l – коэффициент упругости петли, которая находится в клефте, M_G – молекулярная масса а.к.о. петли, K_h – коэффициент упругости водородной связи, M_w – молекулярная масса воды, K_{ch} – коэффициент упругости химической связи хитина, η_{ch} – вязкость хитина, X_a, X_w, X_{ch} – амплитуды колебаний а.к.о. петли (например, глутаминовой кислоты), молекулы воды, молекулы хитина в месте контакта с водой, соответственно, f_0 – динамическая сила, воздействующая на глутаминовую кислоту, ω – частота воздействия на систему осцилляторов.

Подобно тому, как это было сделано в работе [14], резонансные частоты предложенной модели можно определить из уравнения (1):

$$\begin{vmatrix} -M_G\omega^2 + K_l + 2K_h & -2K_h & 0 \\ -2K_h & -M_w\omega^2 + 4K_h & -2K_h \\ 0 & -2K_h & 2K_h + K_{ch} + i\omega\eta_{ch} \end{vmatrix} \begin{vmatrix} X_a \\ X_w \\ X_{ch} \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} f_0 \\ 0 \\ 0 \end{vmatrix} \quad (1)$$

Рассмотрим амплитуду колебаний молекул воды X_w :

$$X_w = \frac{2K_h}{M_G M_w (-\omega^2 + \omega_G^2)(-\omega^2 + \omega_w^2) + M_w \omega_w^2 K_h \left(\frac{M_G(-\omega^2 + \omega_G^2)}{2K_h + K_{ch}(1 + i\omega\tau_{ch})} - 1 \right)} f_0, \quad (2)$$

где $\omega_G^2 = (K_l + 2K_h) / M_G$; $\omega_w^2 = 4K_h / M_w$; $\tau_{ch} = \eta_{ch} / K_{ch}$.

Резонансные частоты системы определим из условия равенства нулю знаменателя выражения (2) при $\omega\tau_{ch} \sim 0$:

$$(-\omega^2 + \omega_G^2)(-\omega^2 + \omega_w^2(1 + \alpha)) - \omega_w^2 K_h / M_G = 0, \quad (3)$$

где $\alpha = K_h / (2K_h + K_{ch}) \ll 1$. (4)

С учетом условия (4) уравнение (3) можно преобразовать к следующему виду:

$$\omega^4 - (\omega_G^2 + \omega_w^2)\omega^2 + \omega_G^2\omega_w^2 - \omega_w^2 K_h / M_G = 0, \quad (5)$$

Так как $2K_h / K_{ch} \ll 1$, $2K_h / K_l \ll 1$, $M_G / M_w = 3.17$, $\omega_G^2 \ll \omega_w^2$, то резонансные частоты системы будут $\omega_1^2 \sim \omega_G^2$, $\omega_2^2 \sim (12.68K_h / K_l)\omega_G^2$, т.е. $\omega_2^2 \ll \omega_1^2$. Из данных [8] $\omega_1^2 / \omega_2^2 = 484$, можно оценить K_l / K_h , которое будет равно $K_l / K_h = 6.14 \cdot 10^3$.

Согласно [6], наиболее продуктивной является низкая частота ω_2 . Поэтому активность фермента будет определяться амплитудой колебаний X_w при ω_2 , т.е.

$$X_w = \frac{K_{ch}(R_s) f_0}{-2K_h K_l \cdot i\omega_2 \tau_{ch}} \quad (6)$$

Так как в выражении (6) от содержания МР – R_s зависят только параметры K_{ch} и τ_{ch} , то активность фермента можно определить как

$$\tilde{A} = |X_w(R_s)|^2 / |X_w(0)|^2 = \tilde{A}_\tau \tilde{A}_{Pl},$$

где $\tilde{A}_\tau = \left[\frac{\tau_{ch}(0)}{\tau_{ch}(R_s)} \right]^2 = \exp(2(U_o(0) - U_o(R_s)) / RT) + \gamma(\sigma(R_s) - \sigma(0)) / RT$, согласно [16-18], $U_o(0)$ и $U_o(R_s)$ – энергетические барьеры, препятствующие разрыву гликозидной связи хитина при $R_s = 0$ и $R_s \neq 0$, $\sigma(0)$ и $\sigma(R_s)$ напряжения, возникающие в хитине при $R_s = 0$ и $R_s \neq 0$, γ – параметр материала (хитина), тогда:

$$\tilde{A}_{Pl} = \left[\frac{K_{ch}(R_s)}{K_{ch}(0)} \right]^2, \quad K_{ch}(R_s) = K_{ch}(0) Pl(R_s),$$

где $Pl(R_s)$ – функция пластификации и $\tilde{A}_{Pl} = (Pl(R_s))^2$.

Выполним оценки \tilde{A}_{Pl} и \tilde{A}_τ на основании экспериментальных данных работы [1]. Для этого определим относительное содержание МР – W_s при $M_{MP} = 124 Da$, $M_{ch} = 204 Da$. Как показывают исследования

хитина, извлеченного из панциря креветок, его средняя молекулярная масса (ММ) составляет 370 и 400 kDa [19]. Более того, получение коллоидного хитина растворением в 85%-ом растворе фосфорной кислоты сопровождается гидролизом [20]. Для оценки ММ гидролизованного хитина воспользуемся данными работы [19] и примем ее равной 100 kDa ($N = 490$). Тогда относительное содержание МР можно рассчитать по уравнению (7).

$$W_s = \frac{M_{MP} R_s}{NM_{ch} + M_{MP} R_s} = \frac{0.6R_s / N}{1 + 0.6R_s / N} \quad (7)$$

В таблице 2 представлены результаты пересчета экспериментальных зависимостей в соответствии с предложенной выше моделью.

Табл. 2. Расчетная и экспериментальная зависимости \tilde{A} от R_s

R_s	W_s	\tilde{A}	\tilde{A}_{exp}	$Pl_c(R_s)$	\tilde{A}_{Pl}	\tilde{A}_τ	$\ln \tilde{A}_\tau$
0	0	1	1	1	1	1	0
6	0.0073	1.1	1.23	0.92	0.85	1.29	0.25
9	0.0109	1.36	-	0.915	0.837	1.624	0.485
12	0.014	1.33	1.32	0.91	0.83	1.6	0.47
18	0.0216	1.6	1.58	0.84	0.71	2.27	0.82
25	0.03	1.56	1.60	0.76	0.58	2.69	0.99
37	0.043	1.75	-	0.745	0.555	3.16	1.15
43	0.05	1.78	-	0.737	0.544	3.265	1.18
50	0.058	1.75	1.67	0.73	0.53	3.3	1.19
80	0.089	1.51	-	0.67	0.45	3.34	1.205
100	0.109	1.83	1.83	0.625	0.39	4.69	1.54

Примечание: \tilde{A}_{exp} при $R_s = 50, 25$ и 18 взяты как средние между ближайшими соседними значениями работы [5], \tilde{A}_{exp} при $R_s = 12$ и 6 соответствуют значениям \tilde{A}_{exp} при $R_s = 11$ и 7 . Серым цветом выделены максимумы \tilde{A} .

При оценке функции пластификации $Pl_c(R_s)$ были взяты данные из работы [21] для амилозы, полагая при этом, что функции пластификации у полисахаридов отличаются друг от друга незначительно.

Оценим, какие члены уравнения вносят основной вклад в $\ln \tilde{A}_\tau$. Допустим, что основной вклад вносит член, связанный с изменением напряжения σ в молекуле хитина вследствие введения МР, т.е.

$\ln \tilde{A}_\tau = 2\gamma(\sigma(R_s) - \sigma(0))/RT$. Введение МР приводит к увеличению объема хитина. За счет поверхностного натяжения напряжение внутри хитина увеличится на величину $2\gamma(\sigma(R_s) - \sigma(0)) = 2\alpha_{ch}\Delta S$, где $\Delta S = \pi(NV_{ch})^{2/3} 2R_s V_{MR} / (3NV_{ch})$, N – степень полимеризации хитина, V_{ch} – ван-дер-ваальсовый объем повторяющегося звена хитина, V_{MR} – ван-дер-ваальсовый объем МР, α_{ch} – коэффициент поверхностного натяжения хитина, $\alpha_{ch} = r\delta_{ch}^2$, согласно [22], r – некоторый характерный размер слоя поверхности клубка хитина, δ_{ch} – параметр растворимости хитина. Вычисления, выполненные при $R_s = 100$ и $T = 300$ К, показывают, что

$\ln \tilde{A}_\tau \gg 2\gamma(\sigma(R_s) - \sigma(0))/RT$. Поэтому изменение \tilde{A}_τ в зависимости от R_s происходит в основном за счет изменения энергетического барьера, препятствующего разрыву химической связи хитина, т.е. $\ln \tilde{A}_\tau = 2(U_o(0) - U_o(R_s))/RT$.

По аналогии с работой [23] запишем $U_o = ART_d$. Тогда $\Delta U_o = U_o(0) - U_o(R_s) = AR\Delta T_d$. В случае хитина $A = 39$, $T_d = 554$ К, а $\Delta T_d = T \cdot \ln \tilde{A}_\tau / 2A \sim 6^\circ$. Изменение энергетического барьера в области максимума активности $\Delta U_o = 1.9$ кДж/моль, т.е. энергия разрыва химической связи под влиянием МР меняется всего на 4.3%.

Как показывают расчеты [22], температура деструкции T_d зависит от вклада полярных групп (водородных связей и диполь-дипольного взаимодействия). Попадание МР внутрь хитина приводит к блокированию вклада части полярных групп в T_d и уменьшению температуры деструкции. Последнее означает, что пластификация хитина МР приводит не только к уменьшению межмолекулярного взаимодействия, но и влияет на химические связи внутри макромолекулы. Согласно данным, приведенным в работе [21], в случае полисахаридов блокирование доступных водородных связей заканчивается при $Pl_c(R_s) = 0.835$, т.е. в области $R_s = 18$, где, как показывают расчеты, приведенные в табл. 2, имеется небольшой максимум активности фермента. Далее при увеличении R_s , в том числе и в области максимальной активности фермента, происходит в основном блокирование диполь-дипольных взаимодействий.

Таким образом, изменение активности фермента при введении МР в раствор фермента и субстрата происходит вследствие действия двух противоположных факторов: с одной стороны при пластификации субстрата 2-метилрезорцином активность фермента падает, а с другой стороны вследствие уменьшения энергии активации распада межатомных связей в субстрате под действием МР активность фермента растет. После достижения максимума активности фермента при $R_s = 100$ происходит спад его активности из-за подавляющего действия пластификации.

Аналитическое описание функции $\ln \tilde{A}_\tau$ кубической параболой на участке $0 \leq R_s \leq 100$ ($\ln \tilde{A}_\tau = 6.2 \cdot 10^{-6}(1.02 \cdot 10^4 - 1.77 \cdot 10^2 R_s + R_s^2)R_s$) дает небольшие пики активности при $R_s = 9, 18$ и 43 (см. табл. 2). Поэтому функция активности фермента в области $R_s \leq 25$ нуждается в более тщательном экспериментальном исследовании (хотя бы при тех значениях R_s , которые приведены в табл. 2). При этом погрешность измерения активности фермента ε не должна превышать 2%. При большей погрешности измерения эти максимумы активности будут восприниматься как ступеньки. И только максимум при $R_s = 43$ может быть выделен при $\varepsilon \sim 5 \div 7\%$ [3].

Обычно при измерениях активности фермента \tilde{A} как функции от R_s регистрируют два максимума, а ступеньки сглаживают при статистической обработке экспериментальных данных. Однако, как будет показано далее, регистрация R_s , соответствующего первой ступеньке, очень важно, так как оно определяет концентрацию МР, при которой наблюдается биологический оптимум активности лизоцима.

Следует заметить, что зависимость $\ln \tilde{A}_\tau$ от R_s при $0 \leq R_s \leq 100$ очень напоминает энергетический спектр жидкого гелия [24]. Минимум активности лизоцима при $R_s = 12$ соответствует концентрации МР, при которой начинается его мицеллообразование [1].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОПТИМУМА АКТИВНОСТИ МЕТИЛРЕЗОРЦИНА

С учетом полученных выше результатов, определим верхнюю границу концентрации алкилрезорцинов, при которой ещё можно использовать МР в пищевой биотехнологии. Для этого воспользуемся опытом пекарей при выпечке ржаного хлеба [25].

Алкилрезорцины содержатся в зернах ржи (в оболочках зерен), где их концентрация в современных сортах колеблется от 114 мг/кг до 243 мг/кг. В ржаной муке концентрация алкилрезорцинов, при которой обеспечивается максимальная ферментативная активность дрожжей, составляет 880 мг/кг, согласно [25]. При средней плотности ржаной муки 630 кг/м³ концентрация МР будет равна 4.5 мМ, т.е. примерно соответствует концентрации МР, при которой обеспечивается максимум ферментативной активности [1]. Далее при замесе теста добавляют остальные компоненты (сахар, яйца, жиры, соль и прочие компоненты), а при выпечке хлеба формируется пористость, что способствует снижению содержания алкилрезорцинов в конечном продукте. Допустим, что в этом случае пик ферментативной активности сместится в сторону первого максимума (табл. 2), которому соответствует относительное содержание алкилрезорцинов W на порядок меньше, чем в опаре, т.е. до 0.45 мМ. Но даже если учесть распределение гомологов

алкилрезорцина в конечном продукте, концентрация МР будет выше ПДК в питьевой воде. Недаром ожа-не, выросшие на белом хлебе, так болезненно реагируют на ржаной хлеб, хотя он им нравится по вкусовым качествам. Однако такая концентрация может служить ориентиром при дальнейшей оптимизации системы лизоцим-алкилрезорцин-субстрат.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, предложенные выше подходы позволяют выявить концентрации алкилрезорцинов, обеспечивающие с одной стороны оптимизацию пищевых технологических процессов, а с другой стороны безопасность для здоровья человека конечного продукта (биологический максимум). Что касается биологического максимума, концентрация конечного продукта в значительной степени будет определяться функцией распределения гомологов, их ПДК. В этом плане представляет интерес исследование связи между полезными свойствами алкилрезорцинов и промежуточными максимумами ферментативной активности.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Мартиросова, Е.И. Регулирование функциональных свойств лизоцима путем взаимодействия с 5-метилрезорцином [Текст] / Е.И. Мартиросова, И.Г. Плащина, Н.Г. Лойко, М.А. Краснова, Г.И. Эль-Регистан // Химическая физика. – 2014. – Т. 33. – № 8. – С. 43-48.
2. Мартиросова, Е.И. Изучение роли алкилоксибензолов в стабилизации и модуляции активности ферментных белков [Текст]: автореф. дисс. ... канд. хим. наук: 03.00.23 – М.: ПХТУ, 2007. – 23 с.
3. Вредные вещества в промышленности. Органические вещества. Т. 1. [Текст] / Под ред. Н.В. Лазарева и Э.Н. Левиной. – Л.: Химия, 1976. – 592 с.
4. биоИнтернет: Банки данных биологических последовательностей: Swiss-Prot and TrEMBL, heneggwhitelysozyme, P00704 [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://old.nsu.ru/education/i4biol/noframes/globseqdb.html>
5. Proteins [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.open.edu/openlearn/science-maths-technology/science/biology/proteins/content-section-6.3>
6. Single Molecule Lysozyme Dynamics Monitored by an Electronic Circuit [Электронный ресурс] / Yongki Choi, et al. // Science. – 2012. – V. 335. – P. 319-324. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3914775/pdf/nihms-514126.pdf>
7. Фёршт, Э. Структура и механизм действия ферментов [Текст] / Э. Фёршт. – М.: Мир, 1980. – 392 с.
8. Suzuki, H. «Chapter 7: Active Site Structure». How Enzymes Work: From Structure to Function [Text] Boca Raton, FL: CRC Press., 2015. – p.p. 117-140.
9. Enzyme [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme>
10. Fukamizo T. Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application [Text] / T. Fukamizo // Curr. Protein Pept. Sci. – 2000. – V. 1. – pp. 105-124.
11. Vocadlo, D.J. Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate [Text] / D.J. Vocadlo, G.J. Davies, R. Laine, S.G. Withers // Nature. – 2001. – 412. – pp. 835-838.

12. Матвеев, Ю.И. Определение основных структурных параметров лизоцима, влияющих на его ферментативную активность [Текст] / Ю.И. Матвеев, И.Г. Плащина // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2010. – Т. 52. – № 6. – С. 945-948.

13. Матвеев, Ю.И. Определение температур перехода в вязкотекучее состояние, денатурации и начала интенсивной деструкции белков в зависимости от их химического строения [Текст] / Ю.И. Матвеев // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 1997. – Т. 39. – № 54. – С. 690-698.

14. Матвеев, Ю.И. Динамическая модель воздействия метилрезорцина на ферментативную активность лизоцима [Текст] / Ю.И. Матвеев, И.Г. Плащина // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2011. – Т. 53. – № 5. – С. 696-698.

15. Hsieh, D.Y. Theory of rectified diffusion of mass into gas bubbles [Text] / D.Y. Hsieh, M.S. Plesset // The Journal of the Acoustical Society of America. – 1961. – V. 33. – № 2. – p. 206-215.

16. Журков, С.Н. Температурная и временная зависимость прочности полимерных волокон [Текст] / С.Н. Журков, С.А. Абасов // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 1961. – Т. 3. – № 3. – С. 441-449.

17. Регель, В.Р. Кинетическая природа прочности твердых тел [Текст] / В.Р. Регель, А.И. Слуцкер, Э.Е. Томашевский. – М.: Наука, 1974. – 560 с.

18. Журков, С.Н. Временная зависимость прочности твердого тела [Текст] / С.Н. Журков, Б.Н. Нарзуллаев // Журнал технической физики. – 1953. – Т. 23. – Вып. 10. – С. 1677-1689.

19. Деструкция хитина и хитозана при химическом гидролизе [Текст] / В.Ю. Новиков [и др.] // Рыбпром: технологии и оборудование для переработки водных биоресурсов. – 2010. – № 2. – С. 64-68.

20. Шабрукова, Н.В. К вопросу изучения строения хитингликоканового комплекса из гриба *Aspergillus niger* [Текст] / Н.В. Шабрукова, В.С. Гамаюрова, Р.З. Мусин [Текст] // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Материалы VIII Международ. конф. – М.: Изд-во ВНИРО. – 2006. – С. 153-158.

21. Matveev, Y.I. Glass transition temperature of proteins. Calculation based on the additive contribution method and experimental data [Text] / Y.I. Matveev, V.Y. Grinberg, I.V. Sochava, V.B. Tolstoguzov // Food Hydrocolloids. – 1997. – V. 11. – № 2. – P. 125-133.

22. Askadskii, A.A. Computational materials science of polymers [Text] / A.A. Askadskii. – Cambridge: International Science Publishing, 2003. – 650 p.

23. Матвеев, Ю.И. Аддитивная схема для определения энергии активации низкотемпературных переходов в полимере [Текст] / Ю.И. Матвеев, А.А. Аскадский // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 1991. – Т. 3. – № 6. – С. 1251-1256.

24. Ландау, Л.Д. Статистическая физика. [Текст] / Л.Д. Ландау, Е.М. Лифшиц. – М.: Наука, 1964. – 568 с.

25. Быченкова, В.В. Исследование влияния 5-алкил-резорцинов на хлебопекарные свойства ржаной муки [Текст] / дис. канд. тех. наук: 05.18.15: защищена 21.12.06 / Быченкова Валерия Владимировна. – СПб., 2006. – 121 с.

Матвеев Юрий Игнатьевич – к.ф.-м.н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля» РАН (ИБХФ РАН) e-mail: yu.matveev@mail.ru

Аверьянова Елена Витальевна – к.х.н., доцент, доцент кафедры биотехнологии, Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», тел. +7(3854)435305, e-mail: bt@bti.secna.ru.

MODELING OF ALKYLRESORCINE IMPACT ON THE ACTIVITY OF ENZYME PROTEINS IN BIOTECHNOLOGIES

Y.I. Matveev¹, E.V. Averyanova²

¹*Institute for Biochemical Physics (IBCP), Russian Academy of Sciences (RAS), Moscow*

²*Biysk Technological Institute (branch) of the Altay State Technical University, Biysk*

Abstract – The reasons for the oscillation of the enzymatic activity of lysozyme when 5-methylresorcine is added to the solution are revealed: on the one hand, 5-methylresorcine alters the activation energy of the decay of interatomic bonds in the substrate, and on the other hand, it plasticizes. It was shown that the biological maximum of lysozyme activity is 1.34 times less than the chemical one. The corresponding concentration of 5-methylresorcine is 34 mg/l. The obtained results can be used to analyze the contribution of homologues of alkylresorcins in medicine and biotechnology.

Index terms: lysozyme, 5-methylresorcine, substrate, enzyme activation mechanisms.

REFERENCES

1. Martirosova, E.I., et al, "Regulation of the functional properties of lysozyme by interaction with 5-methylresorcine" *Chemical Physics*, vol. 33, Issue 8, pp 43-48, 2014.
2. Martirosova, E.I., "Study of the role of alkyloxybenzenes in the stabilization and modulation of the activity of enzyme proteins", Ph.D. author. diss ... kand. chemical Sciences: 03.00.23 - M.: RHTU, 2007.
3. Lazarev, N.V. and E.N. Levina, Harmful substances in industry. Organic substances. Vol. 1. L.: Chemistry, 1976.
4. *BioInternet: Biological sequence data banks: Swiss-Prot and TrEMBL, hen egg white lysozyme*, P00704 <http://old.nsu.ru/education/i4biol/noframes/globseqdb.html>.
5. *Proteins*, <http://www.open.edu/openlearn/science-maths-technology/science/biology/proteins/content-section-6.3>
6. Yongki Choi, et al., *Single Molecule Lysozyme Dynamics Monitored by an Electronic Circuit* // *Science*, V.335, pp. 319-324, 2012, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3914775/pdf/nihms-514126.pdf>
7. Ferst, E., "Structure and mechanism of action of enzymes" M.: Mir, 1980.
8. Suzuki, H. «Chapter 7: Active Site Structure». *How Enzymes Work: From Structure to Function* Boca Raton, FL: CRC Press., 2015.
9. *Enzyme*, <https://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme>
10. Fukamizo, T., "Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application" *Curr. Protein Pept. Sci.*, V.1., pp. 105-124, 2000.
11. Vocadlo, D.J., et al, "Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate" *Nature*, Issue 412, pp. 835-838, 2001.
12. Matveev, Yu.I. and I.G. Plaschina, "Determination of the main structural parameters of lysozyme, affecting its enzymatic activity" *High-Molecular Compounds. Serie A.*, Vol. 52, Issue 6, pp. 945-948, 2010.
13. Matveev, Yu.I., "Determination of temperatures of transition to a viscous state, denaturation and the onset of intensive destruction of proteins depending on their chemical structure" *High-Molecular Compounds. Series A*, V. 39, Issue 54, pp. 690-698, 1997.
14. Matveev, Yu.I. and I.G. Plaschina, "Dynamic model of the effect of methylresorcine on the enzymatic activity of lysozyme" *High-Molecular Compounds. Series A.*, Vol. 53, Issue 5, pp. 696-698, 2011.
15. Hsieh, D.Y. and M.S. Plesset, "Theory of rectified diffusion of mass into gas bubbles" *The Journal of the Acoustical Society of America*, Vol. 33, Issue 2, pp. 206-215, 1961.
16. Zhurkov, S.N. and S.A. Abasov, "Temperature and time dependence of the strength of polymer fibers" *High-molecular compounds. Series A.*, Vol. 3, Issue 3, pp. 441-449, 1961.
17. Regel, V.R., A.I. Slutsker, E.E. Tomaszewski, "The kinetic nature of the strength of solids" M.: Science, 1974.
18. Zhurkov, S.N. and B.N. Narzullaev, "The time dependence of the strength of a solid" *Journal of Technical Physics*, Vol. 23, Issue 10, pp. 1677-1689, 1953.
19. Novikov, V.Yu. et al., "Destruction of chitin and chitosan by chemical hydrolysis" *Rybprom: technologies and equipment for processing aquatic bioresources*, Issue 2, pp. 64-68, 2010.
20. Shabrukova, N.V. V.S. Gamayurova, R.Z. Musin, "To the question of studying the structure of the chippinglucan complex from the fungus *Aspergillus niger*" Modern perspectives in the study of chitin and chitosan: Proceedings of the VIII Intern. conf. M.: Publishing house VNIRO, pp. 153-158, 2006.
21. Matveev, Y.I., V.Y. Grinberg, I.V. Sochava, V.B. Tolstoguzov, "Glass transition temperature of proteins. Calculation based on the additive contribution method and experimental data" *Food Hydrocolloids*, Vol. 11, Issue 2, pp. 125-133, 1997.
22. Askadskii, A.A., "Computational materials science of polymers" Cambridge: International Science Publishing, 2003.
23. Matveev, Yu.I. and A.A. Askadsky, "Additive scheme for determining the activation energy of low-temperature transitions in a polymer" *High-Molecular Compounds. Series A.*, Vol. 3, Issue 6, pp. 1251-1256, 1991.
24. Landau, L.D. and E.M. Lifshits, *Statistical physics*, M.: Science, 1964.
25. Bychenkova, V.V., "The study of the effect of 5-alkyl-resorcinol on the baking properties of rye flour" dis. Cand. those. Sciences: 05.18.15: It is protected 21.12.06, Spb., 2006.

Matveev Yuri Ignatievich – Senior Researcher, Institute of Biochemical Physics (IBCP), Russian Academy of Sciences (RAS), e-mail: yu.matveev@mail.ru

Averyanova Elena Vitalyevna – associate professor at the chair of biotechnology, Biysk Technological Institute (branch) of the Altay State Technical University, +7(3854)435305, e-mail: bt@bti.secna.ru