

УДК 577.154.31

## ВЛИЯНИЕ МОЧЕВИНЫ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ИНУЛАЗЫ

© 2001 г. Т.А. Ковалева, О.М. Кожокина, В.Ф. Селеменев

*Воронежский государственный университет*

Осуществлена иммобилизация инулазы модифицированным глутаральдегидным методом на ионообменной смоле АВ-26. Показано, что при модификации полученного ферментного препарата раствором мочевины в концентрации 8 моль/л матрица носителя оказывает экранирующее воздействие по отношению к молекуле фермента. Установлено, что ингибирующее влияние карбамида на иммобилизованную инулазу устраняется после инкубации со свободным ферментом.

### ВВЕДЕНИЕ

Исследование стабильности иммобилизованных амилаз к различным физико-химическим факторам приобретает особую значимость в связи с возрастающими масштабами применения искусственно связанных с носителем ферментов в промышленности, медицине и аналитических целях [1, 2, 3].

При ковалентном связывании молекулы фермента с матрицей носителя меняется ее микроокружение. Поэтому без специальных исследований невозможно судить о стабильности иммобилизованного энзима по отношению к денатурирующим агентам. В этой связи мы изучили влияние раствора мочевины на физико-химические свойства инулазы, иммобилизованной на анионите АВ-26 глутаральдегидным методом.

### МЕТОДИКА

Объектом исследований служила инулаза (2,1-β-фруктанфруктаногидролаза) из *Aspergillus awamori* ВКМФ-2250, способная гидролизовать инулин и другие полифруктозиды до фруктозы. В качестве субстрата применяли инулин («Srofa», Прага).

Гомогенный препарат инулазы получали из культуральной жидкости осаждением ацетоном при температуре 4-6°C и рН 4. Фракционирование белков проводили сульфатом аммония с последующим освобождением ферментного препарата от низкомолекулярных примесей гель-фильтрацией на сефадексе G-25. Затем применяли ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе и гель-хроматографию на сефадексе G-200. Чистоту инулазы контролировали с помощью гель-электрофореза. Каталитическую активность определяли спектрофотометрическим методом с помощью резорцина [4].

Иммобилизацию фермента осуществляли на анионите АВ-26 при помощи модифицированного нами глутаральдегидного метода, заключающегося в наращивании связующего звена («вставки») между матрицей носителя и молекулой фермента.

Содержание белка в нативной инулазе определяли по методу Лоури, в иммобилизованном ферменте – модифицированным методом Лоури [4].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для исследования стабильности свободного фермента препарат инкубировали с мочевиной (8 моль/л) при температуре 50°C и рН субстрата 4,7 в течение 20 минут с последующим определением каталитической активности. Исходная удельная активность нативной инулазы составляла 10,8 ед/мг; после воздействия мочевины была равна нулю.

Таким образом, добавление 8 моль/л раствора мочевины к препарату свободной инулазы приводит к полной, необратимой денатурации белковой молекулы фермента.

В этой связи изучено влияние данного денатурирующего агента на молекулу инулазы, иммобилизованной на АВ-26 глутаральдегидным методом. Эксперименты проводили на препарате инулазы, хранившейся в течение 2 лет в лабораторных условиях при комнатной температуре, а также на ферменте, использовавшемся в течение этого же срока в реакторе колонного типа в качестве биокатализатора.

К 2 мг препарата иммобилизованной инулазы добавляли 2 мл 8 моль/л раствора мочевины и инкубировали в течение 1 часа в реакторе периодического действия с постоянным перемешиванием. Исходная активность длительное время хранившегося фермента составляла 9,7 ед/мг. После окончания инкубации

ВЛИЯНИЕ МОЧЕВИНЫ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ИНУЛАЗЫ

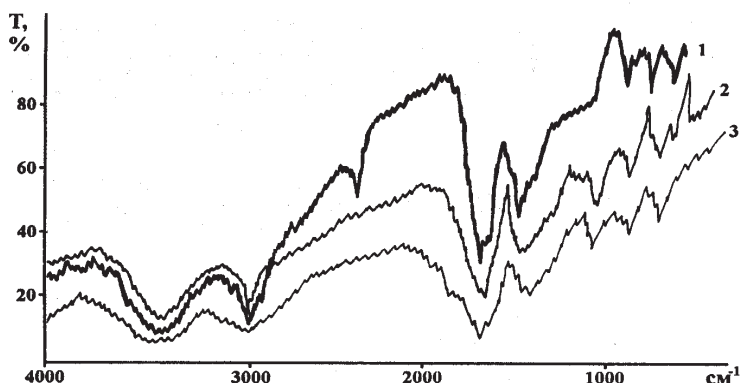


Рис. 1. ИК спектры иммобилизованной инулазы после воздействия мочевины: 1 – иммобилизованная инулаза; 2 – иммобилизованная инулаза в стадии хранения после воздействия раствора 8 моль/л мочевины; 3 – иммобилизованная инулаза, эксплуатировавшаяся в колоночном реакторе, после воздействия мочевины

препарат иммобилизованной инулазы тщательно промывали и осуществляли реакцию гидролиза инулина. В связи с тем, что при иммобилизации оптимальные условия катализа реакции гидролиза инулина изменились мы осуществили проведение эксперимента при рН среды 4,7, температуре 70°C, концентрации субстрата  $8,5 \cdot 10^{-3}$  моль/л (время гидролиза 20 минут). Установлено, что каталитическая активность данного ферментного препарата после модификации карбамидом составляет 3,16 ед/мг.

Благодаря защитному действию матрицы носителя, которая экранирует, каталитически важные группы активного центра фермента, ковалентно связанного с анионом АВ-26, инулаза сохраняет 32,6% от исходной активности.

Аналогичные исследования были проведены с использованием препарата иммобилизованной инулазы, эксплуатировавшегося в реакторе колоночного

типа. Исходная активность данного фермента составляла 13,7 ед/мг. После модифицирования раствором мочевины (8 моль/л) каталитическая активность снизилась на 67,9% и равнялась 4,4 ед/мг.

Для выяснения структурно-функциональных изменений в молекуле фермента под влиянием мочевины были сняты инфракрасные (ИК) спектры [5,6].

В целом характер ИК-спектров обоих препаратов очень схож, однако интенсивность поглощения ИК-излучения длительное время эксплуатировавшимся ферментом несколько ниже, чем для хранившейся инулазы (рис.1).

Анализ ИК-спектров иммобилизованной инулазы свидетельствует о наличии в области 3200-3300  $\text{cm}^{-1}$  полосы поглощения, указывающей на образование водородных связей между NH-группами мочевины и карбонильными группами аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также с OH-группами серина и треонина. NH-группа

Таблица 1. Содержание типов вторичной структуры в препарате иммобилизованной инулазы, находящейся в стадии хранения, после воздействия мочевины

Конформация	Нативный фермент			Воздействие мочевины		
	$\nu, \text{cm}^{-1}$	T, %	%	$\nu, \text{cm}^{-1}$	T, %	%
неупорядоченная структура	1652	51	31,4	1652	50	54,7
$\beta$ -слои	1620	49	55,2	1620	50	18,2
$\alpha$ -спирали	1646	51	13,4	1646	59	27,1

Таблица 2.

Содержание типов вторичной структуры в препарате иммобилизованной инулазы, эксплуатировавшейся в колоночном реакторе, после воздействия мочевины

Конформация	Нативный фермент			Воздействие мочевины		
	$\nu, \text{cm}^{-1}$	T, %	%	$\nu, \text{cm}^{-1}$	T, %	%
неупорядоченная структура	1652	51	31,4	1652	49	57,1
$\beta$ -слои	1620	49	55,2	1620	47	17,4
$\alpha$ -спирали	1646	51	13,4	1646	57	25,5

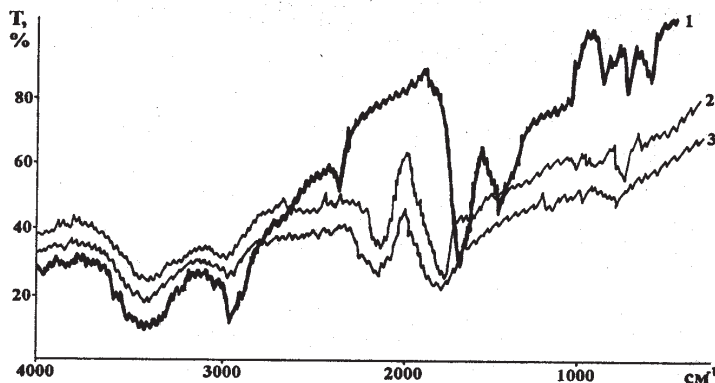


Рис. 2. ИК спектры иммобилизованной инулазы после воздействия мочевины и реактивации свободным ферментом  
 1 – иммобилизованная инулаза  
 2 – иммобилизованная инулаза в стадии хранения после воздействия мочевины и реактивации  
 3 – иммобилизованная инулаза, эксплуатировавшаяся в реакторе колоночного типа, после воздействия мочевины и реактивации

мочевины оказывает сильное воздействие на внутримолекулярные водородные связи белковой глобулы. Вследствие этого происходит разрыв связей данного типа и образование новых между карбонильными и амидными группами аспарагина и глутамина и соответствующими группами мочевины. Подобные изменения в системе водородных связей, очевидно, влияют и на гидрофобные взаимодействия боковых групп полипептидной цепи.

Наличие полос поглощения в областях  $3200-3493\text{ см}^{-1}$  и  $1621-1650\text{ см}^{-1}$  свидетельствует о сохранении ковалентных связей молекулы инулазы с матрицей носителя.

Анализ ИК-спектров иммобилизованной инулазы, модифицированной мочевиной, показывает, что в области  $1510-1550\text{ см}^{-1}$  происходит наряду с изменением интенсивности поглощения сдвиг полосы. Это свидетельствует о нарушении соотношения упорядоченных и нерегулярных участков во вторичной структуре молекулы белка.

Анализируя данные таблиц 1 и 2, можно сделать заключение о том, что под влиянием мочевины в молекуле иммобилизованной инулазы уменьшается протяженность  $\beta$ -слоев в 3 раза, а количество нерегулярных участков возрастает на 80% по сравнению с нативным препаратом.

Таким образом, сохранение частичной каталитической активности иммобилизованной инулазой обусловлено защитным действием матрицы носителя, экранирующей функционально важные группы активного центра фермента.

Известно, что для иммобилизованных ферментов мочевины (8 моль/л) является обратимым денатурирующим агентом [7,8]. Мы провели серию экспериментов, направленных на выявление возможности устранения ингибирующего воздействия карбамида.

Таблица 3.  
 Содержание типов вторичной структуры в препарате иммобилизованной инулазы, находящейся в стадии хранения, после модификации мочевиной и реактивации свободным ферментом

Конформация	Нативный фермент			Реактивированный фермент		
	$\nu, \text{ см}^{-1}$	T, %	%	$\nu, \text{ см}^{-1}$	T, %	%
Неупорядоченная структура	1652	51	31,4	1652	50	57,5
$\beta$ -слои	1620	49	55,2	1620	51	18,6
$\alpha$ -спирали	1646	51	13,4	1646	57	23,9

Таблица 4.  
 Содержание типов вторичной структуры в препарате иммобилизованной инулазы, эксплуатировавшейся в реакторе колоночного типа, после модификации мочевиной и реактивации свободным ферментом

Конформация	Нативный фермент			Реактивированный фермент		
	$\nu, \text{ см}^{-1}$	T, %	%	$\nu, \text{ см}^{-1}$	T, %	%
Неупорядоченная структура	1652	51	31,4	1652	49	57,6
$\beta$ -слои	1620	49	55,2	1620	48	19,1
$\alpha$ -спирали	1646	51	13,4	1646	56	23,3

К 2 мг препарата иммобилизованной инулазы, модифицированной мочевиной, добавляли 2 мг свободной инулазы и осуществляли инкубацию в течение 1 часа. Реакцию гидролиза инулина проводили в стандартных условиях.

Показано, что каталитическая активность длительного хранения фермента увеличилась до 8,22 ед/мг, что составляет 84,7% от исходной активности иммобилизованной инулазы.

Обработав выше описанным способом препарат иммобилизованной инулазы, работавшей в течение 2 лет в колоночном реакторе, мы обнаружили, что ее активность равняется 10,2 ед/мг или 74,5% от исходной активности.

Анализ ИК-спектров ковалентно связанной с АВ-26 инулазы, хранившейся в лабораторных условиях, и фермента, работавшего в течение 2 лет в реакторе колоночного типа в качестве биокатализатора, после модификации 8 моль/л раствором мочевины и реактивации свободной инулазой показывает их большое сходство (рис.2).

Для спектров обоих препаратов иммобилизованной инулазы характерно усиление интенсивности поглощения при  $3300\text{ см}^{-1}$ , которое обусловлено колебательными переходами за счет растяжения NH-связей. Отсутствие полосы поглощения при  $2520\text{ см}^{-1}$  в сравнении со спектром нативного препарата иммобилизованной инулазы указывает на исчезновение асимметричных колебаний карбоксильных групп. Снижение интенсивности поглощения в областях амид I и амид II свидетельствует об изменениях в соотношении типов вторичной структуры ферментов по сравнению с немодифицированным препаратом (табл.3,4).

Видно, что воздействие свободной инулазы, хотя и повышает активность препарата иммобилизован-

ного фермента, но не оказывает влияние на вторичную структуру макромолекулы белка, оставляя соотношение  $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -слоев и нерегулярных участков тем же, что и после воздействия мочевины.

Восстановление каталитической активности модифицированной карбамидом иммобилизованной инулазы после инкубации со свободным ферментом может быть объяснено адсорбцией нативной инулазы на поверхности матрицы носителя. Таким образом, реактивированный фермент связан с анионом АВ-26 одновременно и ковалентно, и адсорбционно.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ладур Т.А.* Производство сахаристых продуктов из крахмалосодержащего сырья с применением ферментов. М. ЦНИИТЭ Пищепром. 1978. 472 с.
2. Ферментные препараты в пищевой промышленности /Под ред. В.П. Кретовича. М. Пищ. пром-сть. 1975. 535 с.
3. *Фениксова Р.В.* Гидролитические ферменты микроорганизмов и их применение в народном хозяйстве. М. Наука. 1972. 36 с.
4. *Кочетов Г.А.* Практическое руководство по энзимологии. М.: Высш. шк. 1980. 273 с.
5. *Утянская В.А., Чикин Г.А., Селеменёв В.Ф., Завьялова Т.А.* Инфракрасная спектроскопия ионообменных материалов. Воронеж. Изд-во ВГУ. 1989. 208 с.
6. *Виноградова Р.П., Цудзевич В.А., Храпунов С.Н.* Физико-химические методы в биологии. Киев. 1983. С.208-217.
7. *Березин И.В., Мартинек К.* Основы физической химии ферментативного катализа. М.: Высш. шк. 1977. 280 с.
8. *Попова С.В.* Анализ кинетики и регуляторных функций олигомерных ферментов: Автореф. дисс. ...канд. биол. наук. 1980. 24 с.