

УДК 577.154.31

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ТЕРМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ

© 2003 г. Т.А. Ковалева, О.М. Кожокина, Л.А. Битюцкая*, Т.Г. Меньшикова*

Воронежский государственный университет

Биолого-почвенный факультет

**Физический факультет*

Изучена термическая инактивация глюкоамилазы с использованием спектрофотометрического метода, цифровой методики дифференциально-термического анализа (ДТА) и др. Показана термоустойчивость данного фермента в широком диапазоне температур. Подтверждено наличие четвертичной структуры глюкоамилазы, представленной двумя субъединицами.

ВВЕДЕНИЕ

При изучении свойств белковых молекул одним из наиболее важных является вопрос об их лабильности. Многочисленные данные литературы свидетельствуют о том, что макромолекулы способны быстро реагировать на изменение микроокружения. *In vivo* существуют различные способы модификации окружающей белковую молекулу внутриклеточной среды, которая влияет на баланс взаимодействий, определяющих ее конформацию. Одним из таких модификаторов является температура, действующая, по крайней мере, двумя путями. Возрастание температуры может изменять характер растворителя вследствие увеличения средней степени деформации молекул воды или уменьшения среднего размера и числа связанных водородными связями «мерцающих кластеров» молекул воды. В любом случае повышение температуры оказывает дезорганизующее влияние как на растворитель, так и на белковую макромолекулу, делая доступными конформации с большей свободной энергией и приводя, в конечном счете, к более развернутой форме молекулы. [1,2,3] В результате увеличения «теплового напряжения» в местах слабых взаимодействий, удерживающих одну или несколько полипептидных цепей, происходит разрыв слабых и сильных связей.

Влияние температуры на скорость ферментативных реакций может быть обусловлено действием ряда различных факторов. Температура влияет на стабильность фермента, на скорость распада фермент-субстратного комплекса, определяемого по величине теплоты активации реакции; на сродство фермента к субстрату; на сродство фермента к активаторам или ингибиторам (если таковые имеются); на природу ключевой реакции (если в системе уча-

ствуют несколько ферментов с различными температурными коэффициентами).

Данная работа посвящена изучению влияния температуры на стабильность молекулы глюкоамилазы (α -1,4:1,6 глюкан – 4,6 – глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3), катализирующей реакцию гидролиза крахмала до глюкозы и широко используемой в различных отраслях пищевой промышленности (хлебопечении, спиртовой, кондитерской и т.д.).

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служил ферментный препарат глюкоамилазы Кормей ГА (Франция). В качестве субстрата использовали водорастворимый крахмал.

Каталитическую активность глюкоамилазы регистрировали спектрофотометрически с помощью глюкозооксидазного метода с использованием реагентов «GLUCOSE E-D» («OLVEX DIAGNOSTICUM», Россия). Содержание белка в препарате фермента определяли по методу Лоури. [4]

При исследовании термостабильности глюкоамилазы фермент инкубировали при температурах 50° С, 60° С, 70° С с последующим определением каталитической активности при нагревании белка в течение 10, 20, 30, 40, 50 минут.

Для исследования процесса денатурации глюкоамилазы использовали цифровую методику дифференциально-термического анализа (ДТА). Контролируемая длина записи и полоса пропускания усилителя постоянного тока позволили определить условия, при которых на кривых ДТА идентифицируется процесс денатурации в динамическом режиме [5].

Метод ДТА позволяет выявлять локальные особенности изменения разности температур (ΔT) между эталоном и образцом при фиксированной массе вещества и при различных масштабах температур-

но-временной шкалы. Использование данной методики позволило фиксировать в динамическом режиме эволюцию сложных систем, таких как белковые молекулы, при изменении температуры.

В наших опытах использовали водные растворы глюкоамилазы в концентрации 10^{-5} моль/л. Эксперименты проводили в стандартных кюветах (пробирках), в качестве датчика использовали медь-константановые термопары.

Исследования осуществляли в динамическом режиме (скорость нагрева $v = 1-2$ К/мин). Для выявления влияния начальных условий на процесс денатурации образца нагрев производили в двух режимах: 1 - от 20°C до 100°C и 2 - от 40°C до 100°C .

Для обработки экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наши эксперименты по исследованию влияния температуры на каталитическую активность глюкоамилазы показали, что фермент относится к числу термоустойчивых белков и даже при 80°C его активность сохраняется на 30% от максимальной величины. Температурный оптимум функционирования глюкоамилазы лежит в пределах $45-70^{\circ}\text{C}$ с максимальной активностью при 50°C (рис. 1).

Нелинейность зависимости каталитической активности глюкоамилазы от температуры реакции гидролиза крахмала определяется, по крайней мере, двумя различными факторами: с одной стороны – увеличением начальной скорости реакции при повышении температуры до оптимального значения, с другой – деструкцией фермента при более высоких значениях температуры, обуславливающей непрерывное уменьшение числа активных центров, участвующих в катализе. Оптимальная температура реакции гидролиза крахмала зависит от соотношения влияния температуры на скорость ферментативной реакции и ее воздействием на скорость деструкции фермента.

Наши исследования показали, что зависимость скорости ферментативной реакции гидролиза крахмала от концентрации субстрата не соответствует уравнению Михаэлиса (рис.2). При исследовании физико-химических свойств глюкоамилазы методом гель-хроматографии показано, что фермент имеет четвертичную структуру, состоящую из двух субъединиц. Поэтому зависимость скорости реакции гидролиза крахмала от концентрации субстрата характеризуется наличием двух стационарных режимов. Усложнение нелинейной зависимости каталитической активности фермента от температуры и изгибы в области диапазона оптимальных температур определяется также наличием двухсубъединичной чет-

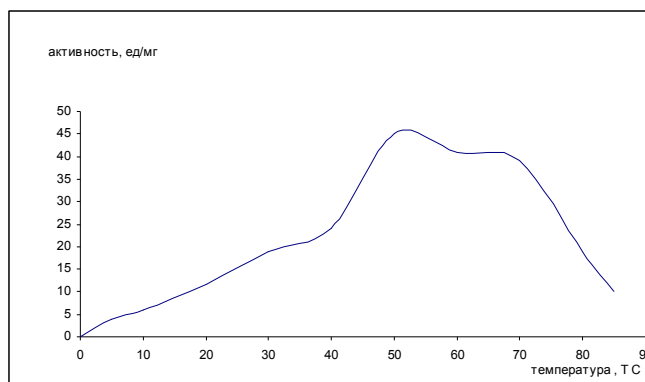


Рис. 1. Зависимость каталитической активности глюкоамилазы от температуры

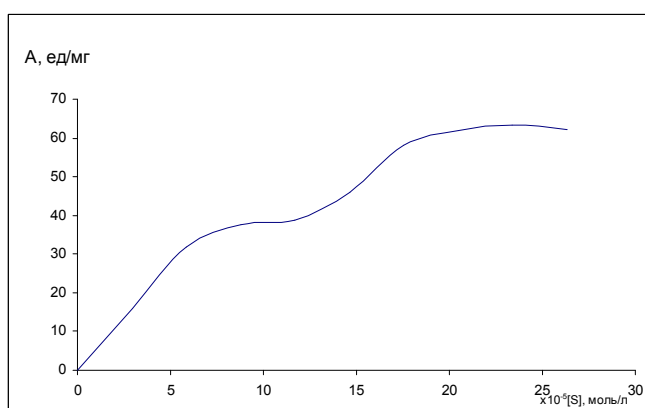


Рис. 2. Зависимость каталитической активности глюкоамилазы от различных концентраций крахмала

вертичной структуры глюкоамилазы и каталитической активностью обоих глобул.

Известно, что субъединицы, образующие четвертичную структуру фермента, могут быть различными как по строению, так и по функциональным свойствам [6]. Они могут объединять в одной структуре несколько взаимосвязанных функций, что способствует созданию полифункциональной молекулы [7]. Кроме того, субъединицы, образующие симметричную четвертичную структуру, бывают идентичными, однотипными, эволюционно родственными белками, которые обладают одинаковым способом свертывания пептидной цепи в пространстве [8]. Межсубъединичные контакты, определяющие существование четвертичной структуры, представляют собой весьма развитую сеть нековалентных взаимодействий: водородных связей, гидрофобных сил сцепления, а также электростатических взаимодействий между противоположно заряженными группами субъединиц. Наши экспериментальные данные свидетельствуют о тождественности субъединиц, образующих молекулу глюкоамилазы.

Нами была исследована термическая инактивация глюкоамилазы при температурах $50, 60, 70^{\circ}\text{C}$. При 50°C резкое изменение каталитической актив-

ности глюкоамилазы наблюдали уже через 10 минут инкубации данного фермента. При дальнейшем увеличении времени воздействия температуры на исследуемый фермент скорость ферментативной реакции гидролиза крахмала не изменяется. При 60°C происходит монотонное снижение каталитической активности глюкоамилазы в течение всего времени воздействия исследуемого фактора. При воздействии температуры 70°C каталитическая активность глюкоамилазы сохраняется всего на 5 % от максимальной величины в течение 30 минут, причем эта остаточная активность не зависит от времени воздействия температуры, а к 50 минутам исчезает полностью. Наши данные показали, что при термоинактивации глюкоамилазы при 50° и 60° фермент сохраняет 80-90% активности в течение всего времени нагревания препарата, а при 70° С инактивируется полностью. Деструкция фермента при более высоком значении температуры, обуславливающая непрерывное уменьшение концентрации активных центров фермента, вовлеченных в катализ, проявляется в усилении нелинейности полученных кривых при повышении температуры (рис.3). Оптимальная температура зависит от соотношения между влиянием температуры на скорость ферментативной реакции и ее влияние на скорость деструкции фермента, так что наблюдаемые величины температурных оптимумов, в сущности, не имеют особого значения. Скорость инактивации фермента в растворе быстро возрастает с повышением температуры от 50° С до 70° С. Полученные данные указывают на то, что термическая инактивация глюкоамилазы представляет собой типичную реакцию первого порядка. Следует отметить высокую термоустойчивость глюкоамилазы: экспериментальные данные показывают, что остаточная активность глюкоамилазы сохраняется даже после термостабирования при 70° С в течении 40 минут.

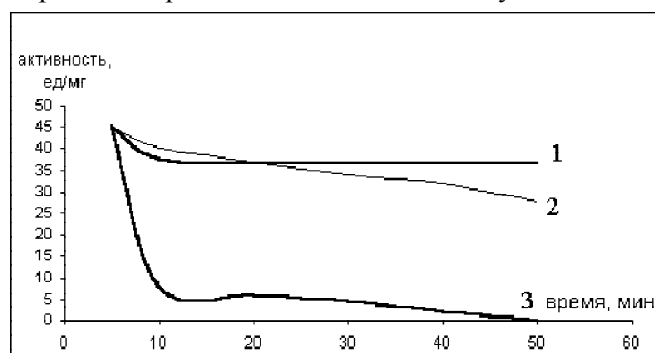


Рис. 3. Динамика инактивации глюкоамилазы при различных температурах.

- 1- кривая термоинактивации глюкоамилазы при 50° С
- 2- кривая термоинактивации глюкоамилазы при 60° С
- 3- кривая термоинактивации глюкоамилазы при 70° С

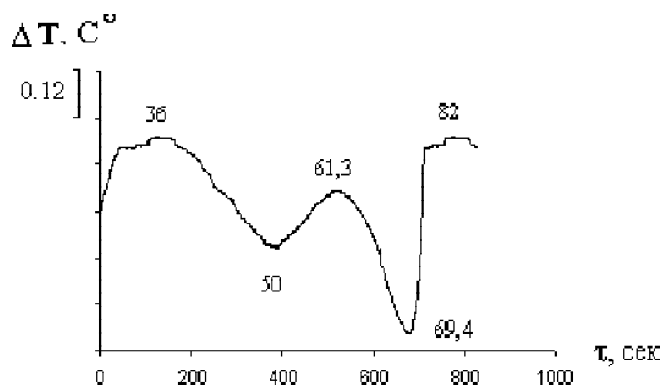


Рис.4. Кривая ДТА тепловой денатурации глюкоамилазы

Методом цифрового дифференциально-термического анализа были получены данные, подтверждающие наличие двух субъединиц, образующих четвертичную структуру молекулы глюкоамилазы. На кривой ДТА (рис.4) наблюдаются эндотермические пики, соответствующие метастабильным состояниям, возникающим при температурах, меньших температуры денатурации. Процесс денатурации включает несколько стадий, которые можно связать с разворачиванием полипептидных цепей. Процесс денатурации не обязательно сопровождается полным разворачиванием молекулы, приводя к возникновению новых конформационных состояний. Очевидно, что не все промежуточные состояния структурно эквивалентны и при некоторых условиях молекулы белка не являются полностью развернутыми [5, 9].

Анализ данных литературы позволяет заключить, что белки при температурах значительно ниже температуры денатурационного перехода претерпевают существенные конформационные перестройки типа локальных изменений. Каждой температуре соответствует своя конформация белковой глобулы [2]. В последние годы все большее внимание уделяется идее существования расплавленной глобулы как стабильного промежуточного состояния на пути сворачивания-разворачивания [10].

Результаты, полученные методом ДТА, коррелируют с данными биохимических исследований, что позволяет говорить о том, что денатурация идет не по механизму перехода между двумя состояниями, а через ряд промежуточных стадий между нативной и полностью денатурированной глобулами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. Т. 1. 392 с.
2. Кушнер В.П. Конформационная изменчивость и денатурация биополимеров. Л.: Наука, 1977. 275с.
3. Александров В.Я. Клетки, макромолекулы и температура. Л.:Наука, 1975. 293с.

4. *Кочетов Г.А.* Практическое руководство по энзимологии. М:Высшая школа, 1980. 273 с.
5. *Bityutskaya L.A., Mashkina E.S.* //Phas. Transition. 2000. V. 71. P.317-330.
6. *T. Ashikari, N. Nakamura, Y. Tanaka et. al.* //Arg. Biol. Chem. 1986. Vol. 50(4).P. 957 – 964.
7. *Yould G.W., Bell G.I.* //Trends Biochem. Sci. 1990. Vol. 15. P.18 - 23.
8. *A.E. Aleshin, C.Hoffmann, L.M.Firsov et. al.* //J. Mol. Biol. 1994. Vol.238. P.575 – 591.
10. *Битюцкая Л.А., Машкина Е.С.* // ЖФХ.2000. Т.74, № 7. С.1189-1194
11. *Волынская А.В., Касумов Э.А., Шишков А.В.* // Молекулярная биология 1998. Т.32, №3. С.463-472.