

КИСЛОТНАЯ И ТЕРМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ИНУЛИНАЗЫ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА СТИРОСОРБЕ

И. В. Шкутина¹, О. Ф. Стоянова², В. Ф. Селеменев², Г. Ю. Харченко³

¹ Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия

² Воронежский государственный университет

³ Воронежский государственный педагогический университет

Поступила в редакцию 25.04.2015 г.

Аннотация. Предложен гетерогенный биокатализатор на основе инулиназы, иммобилизованной на неионогенном сорбенте Стиросорб. Проведена термическая и кислотная инактивация свободной и иммобилизованной инулиназы. Рассчитаны соответствующие значения констант инактивации. Выявлено увеличение термостабильности иммобилизованного фермента по сравнению со свободным. С помощью метода ИК спектроскопии рассмотрено влияние термоинактивации на структуру фермента.

Ключевые слова: инулиназа, Стиросорб, иммобилизация, каталитическая активность, инактивация.

Abstract. The heterogeneous biocatalyst based on inulinase immobilized on the non-ionogenic sorbent of Stirosorb was proposed. Investigation of thermic and acid inactivation of free and immobilized inulinase was carried out. The corresponding values of the inactivation constants were rated. Increase of thermal stability of the immobilized ferment compared to the free one was exposed. The effect of thermic inactivation on enzyme structure was examined with the help of the method of IR - spectroscopy.

Keywords: inulinase, Stirosorb, immobilization, catalytic activity, inactivation.

В настоящее время в значительной степени пересмотрены ранее сформированные подходы к производству пищевой продукции. Постепенно увеличивается ее качество при возрастающих требованиях к экологической чистоте производственных процессов. Внедряются более эффективные технологии, основанные на принципиально новых подходах к организации малоотходных и циклических энерго- и ресурсосберегающих производств. Большое внимание в последние годы уделяется процессам получения продуктов из возобновляемого растительного сырья.

К одному из перспективных направлений переработки растительного сырья относится выделение фруктозы из инулинсодержащих растений. Фруктоза широко применяется в качестве сахарозаменителя в диабетическом, диетическом питании, в пищевой и фармацевтической промышленности. Получение фруктозы из инулина возможно путем кислотного или ферментативного гидролиза. В отличие от кислотного гидролиза ферментативный процесс превращения инулина с помощью

инулиназы (2,1-β-D-фруктан-фруктаногидролаза, КФ 3.2.1.7) является гораздо экологичнее, протекает при более низкой температуре и требует меньшей концентрации ионов водорода. При этом не образуются побочных продуктов, которые осложняют выделение и очистку фруктозы. Расщепление инулинсодержащего сырья с использованием инулиназы позволяет получить в одну стадию 95%-ый фруктозный сироп [1].

Общепризнано, что при промышленном масштабировании каталитических процессов гетерогенный режим их проведения является экономически более выгодным по сравнению с гомогенными технологиями, так как при этом значительно упрощается и удешевляется весь производственный цикл. Иммобилизация способствует, прежде всего, многократному использованию гетерогенных биокатализаторов и повышению их устойчивости к денатурирующим факторам среды [2-3].

Ранее нами были представлены данные по иммобилизации инулиназы на сверхситом сорбенте Стиросорб [4]. Целью настоящей работы является исследование процессов кислотной и термической инактивации полученного биоката-

© Шкутина И. В., Стоянова О. Ф., Селеменев В. Ф., Харченко Г. Ю., 2015

лизатора при ферментативном гидролизе инулина.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись препараты свободной и иммобилизованной инулиназы *Aspergillus awamori* ВКМФ 2250, в качестве субстрата использовался инулин («Spofa», Прага). Носителем фермента служил сверхсшитый неионогенный сорбент на основе стирола с дивинилбензолом – Стиросорб ($S_{уд.} = 910 \text{ м}^2/\text{г}$) [5].

Иммобилизацию осуществляли адсорбционным методом в статических условиях при температуре 20°C при периодическом перемешивании в течение 4 часов. Общее количество белка в нативных ферментных препаратах определяли методом Лоури, в иммобилизованных ферментах – модифицированным методом Лоури [6]. Десорбция белка в буферные растворы составляла не более 2%. Стандартное отклонение полученных результатов не превышало величину 0,01.

Определение активности ферментных препаратов проводили в термостатируемом реакторе с перемешиванием. Каталитическую активность измеряли фотометрическим методом по реакции Селиванова с помощью резорцина [7]. Активность инулиназы рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{a}{180b},$$

где A – каталитическая активность, ед/мг белка; a – количество образовавшейся фруктозы, мкг; b – концентрация фермента в реакционной смеси, мг/мл гидролизата; t – время гидролиза, мин; 180 – молекулярная масса фруктозы. При расчете активности иммобилизованного фермента учитывали содержание белка в 1 г носителя.

В работе были исследованы препараты иммобилизованной инулиназы с содержанием белка 25.5 мг/г носителя и активностью 10.8 ед/мг.

Для исследования цикличности действия гетерогенного биокатализатора носитель с иммобилизованным ферментом (100 мг) помещали в пробирки с субстратом (10 мл $5 \cdot 10^{-4}$ М раствора инулина) и проводили гидролиз, меняя через каждый час субстрат и измеряя каталитическую активность.

Термическую и кислотную инактивацию нативного и иммобилизованного ферментов проводили термостатированием в 0.1 М ацетатном буфере при рН 3.0 – 6.0, температурах 40–70 °С.

Для этого в пробирки помещали соответственно по 10 мл раствора инулиназы и навески 100 мг иммобилизованного препарата, добавляли по 10 мл ацетатного буфера. Растворы инкубировали при данных условиях и через определенные промежутки времени определяли остаточную активность образцов по отношению к исходному раствору с концентрацией инулина $5 \cdot 10^{-4}$ М.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из основных свойств гетерогенных биокатализаторов является каталитическая активность, которая, как правило, при иммобилизации уменьшается из-за структурно-функциональных свойств белка и диффузионных затруднений при подходе субстрата к каталитическим группам активного центра фермента. При сравнении свойств свободного и иммобилизованного ферментных препаратов (табл.1) было отмечено, что иммобилизация приводит к незначительному уменьшению V_{max} реакции гидролиза инулина и увеличению константы Михаэлиса K_m , что свидетельствует о сохранении нативной структуры белка при адсорбционной иммобилизации. Нами было выявлено, что кислотный и температурный оптимумы для иммобилизованной на Стиросорбе инулиназы совпадают с таковыми для свободного фермента.

Таблица 1

Физико-химические свойства свободной и иммобилизованной инулиназы

Определяемая характеристика	Свободная инулиназа	Иммобилизованная инулиназа
рН-оптимум активности	4.5-5.0	4.5-5.0
Температурный оптимум активности, °С	50-55	50-55
V_{max} , мкмоль мг/мин	13,84	12.51
$K_m \cdot 10^{-4}$, моль/л	1.92	2.53
Кол-во циклов	1	11
Константа скорости термоинактивации при хранении 1 год, $k \cdot 10^{-3}$, мин ⁻¹	2.96	0.58

Активность иммобилизованной инулиназы на Стиросорбе составляет 91% от активности нативного фермента. Несмотря на некоторое снижение активности фермента при иммобилизации, интегральная активность, которая определяется суммарным количеством полученной фруктозы,

значительно выше. Кроме того, гетерогенный биокатализатор можно использовать в среднем 10 циклов, при этом активность после десяти реакционных циклов составляет 13% от исходной активности инулиназы. При хранении иммобилизованного фермента при температуре 0–2 °С наблюдалось незначительное снижение каталитической активности по истечении 1 года, что свидетельствует об эффективности предложенного способа иммобилизации.

При разработке эффективных методов использования фермента необходимо учитывать его термо- и рН-стабильность. Денатурирующие воздействия температуры и рН среды в водных растворах взаимосвязаны, поэтому их действие в большинстве случаев рассматривается как совместное. Определяющую роль в инаktivации при низких температурах выполняют ионы водорода, при высоких температурах – тепловая энергия [8]. В производственных условиях с целью увеличения заданной степени конверсии субстрата и обеспечения бактерицидных условий ферментативный гидролиз инулина проводят при температуре 50–55 °С.

На рис.1 представлена динамика процесса инаktivации свободного и иммобилизованного фермента при температурах 60–70 °С и рН 4.7, соответствующему максимальной активности инулиназы *Aspergillus awamori*. Увеличение температуры до 70 °С приводит к более резкому уменьшению активности инулиназы. При этом процент сохранения активности свободной инулиназы после часа инкубации составляет 13%, иммобилизованной – 38% от первоначальной активности. Это, вероятно, связано с тем, что при сравнительно невысоких температурах происходит разрушение, главным образом, водородных связей. При повышении температуры от 60 до 70 °С скорость инаktivации увеличивается, поскольку тепловая энергия вызывает разрушение электростатических и гидрофобных взаимодействий, которые вносят большой вклад в стабильность белков. В результате этого возникает более глубо-

кое развертывание полипептидной цепи [9].

Количественной характеристикой процесса денатурации белка является константа скорости инаktivации [10]. Инаktivация ферментов в большинстве случаев является реакцией первого порядка и описывается уравнением:

$$k = \frac{2,303}{\tau} \lg \frac{[A_0]}{[A]}$$

где k – константа инаktivации, мин^{-1} ; $[A_0]$ – исходная активность инулиназы, принятая за 100%; $[A]$ – активность фермента в момент времени τ , % от исходной; τ – время, мин.

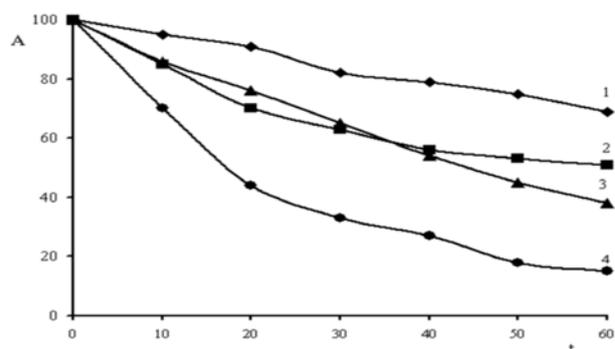


Рис. 1 Кинетические кривые термоинаktivации свободной (2,4) и иммобилизованной (1,3) инулиназы при 60 и 70 °С, соответственно: А – активность (% от максимальной); t – время инкубации, мин.

Сравнительный анализ совместного действия рН и температуры на активность свободной и иммобилизованной инулиназы показал, что связывание фермента с носителем приводит к повышению устойчивости белковой макромолекулы. Для иммобилизованного фермента отмечено уменьшение константы инаktivации по сравнению с нативным ферментом при всех рассматриваемых условиях (табл.2).

Методом ИК спектроскопии исследовано влияние денатурирующих факторов среды на конформацию белка. Соотношение типов вторичной

Таблица 2

Влияние температуры и рН среды на константу скорости инаktivации свободной (I) и иммобилизованной (II) инулиназы

Температура, °С	$k \cdot 10^{-3}, \text{мин}^{-1}$ при рН							
	3.2		4.0		4.7		6.2	
	I	II	I	II	I	II	I	II
40	22.88	7.09	3.68	1.20	1.92	0.67	16.40	4.05
50	29.24	12.82	8.70	4.74	7.11	3.08	21.04	7.63
60	46.43	21.81	15.54	6.61	12.13	5.65	26.56	12.82
70	57.87	28.30	38.02	19.87	33.67	15.97	49.44	26.56

Таблица 3

Содержание типов вторичной структуры свободной и иммобилизованной инулиназы в процентах (%)

Конформация	ν , см ⁻¹	I	II	III	IV
α	1521	29	25	14	18
β -слои	1538	28	24	9	17
Неупорядоченная структура	1548	43	51	77	65

I, II – инулиназа нативная и иммобилизованная, III, IV – после инактивации, соответственно.

структуры в белке определяли, исходя из закона Бугера-Ламберта-Бера. Для анализа использовали полосу Амид II, хорошо проявляющуюся как в спектрах свободной, так и иммобилизованной инулиназы [11]. Результаты расчета типов вторичной структуры (табл.3.) для свободного и иммобилизованного фермента показывают, что конформация инулазы при иммобилизации почти не изменяется. На спектрограммах фермента при инактивации (70°C) в течение 30 мин отмечено значительное увеличение процентного содержания неупорядоченной структуры белка, причем для свободной инулиназы в большей степени, чем для иммобилизованной. Можно предположить, что при связывании с носителем происходит повышение жесткости третичной структуры, препятствующей деформационному разворачиванию белковой макромолекулы. Поэтому чувствительность иммобилизованной инулиназы к изменению pH и температуры меньше, чем у нативного фермента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено влияние температуры и концентрации ионов водорода на активность свободной и иммобилизованной на Стиросорбе инулиназы. Установлено, что гетерогенный биокатализатор отличается большей устойчивостью к денатурирующим факторам среды (T, pH), чем гомогенный. Полученные данные могут быть использованы для количественной оценки стабильности иммобилизованного фермента в производственных условиях в реакциях биокаталитического превращения инулинсодержащего сырья.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Корнеева О.С. Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия

Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия

Шкутина И. В., к.б.н., старший преподаватель кафедры аналитической химии

E-mail: irn55@mail.ru

на олиго- и полисахариды / О.С. Корнеева. — Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. у-та, 2001. — 184 с.

2. Березин И.В. Исследования в области ферментативного катализа и инженерной энзимологии / И.В. Березин. — М.: Наука, 1990. — 382 с.

3. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы / пер. с англ. Под ред. Дж. Вудворда. — М.: Мир, 1988. — 215 с.

4. Шкутина И.В. Гидролиз инулина с помощью гетерогенных биокатализаторов / И.В. Шкутина, О.Ф. Стоянова, В.Ф. Селеменев // Химия растительного сырья. — 2012. — №2. — С. 27–31.

5. Davankov V.A. Hypercrosslinked polymers basic principle of preparing the new class of polymeric materials / V.A. Davankov, M.P. Tsyurupa // Reactive Polymers. — 2002. — V.53, № 1. — P. 193–203.

6. Chibata I. Industrial application of immobilized enzyme system / I. Chibata // Pure and Appl. Chem. — 1978. — V. 50, N 7. — P. 667– 675.

7. Nakamura T. General properties of extracellular inulase from *Penicillium* / T. Nakamura, S. Nakatsu // J. Agr. Chem. Loc. Jap. — 1997. — V.1, N 12. — P. 681– 689.

8. Жоли М. Физическая химия денатурации белков / М. Жоли. — М.: Мир, 1968. — 364с.

9. Путнам Ф. Денатурация белков / Ф. Путнам. — М.: Мир, 1984. — 294 с.

10. Варфоломеев С.Д. Биокинетика : Практический курс / С.Д. Варфоломеев, К.Г. Гуревич. — М.: Фаир-Пресс, 1999. — 720 с.

11. Казицына Л.А. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии / Л.А. Казицына, Н.Б. Куплетская. — М.: Высшая школа, 1971. — С.264.

Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy

Shkutina I. V., Ph.D. (Biology), Senior Assistant, Department of analytic chemistry

E-mail: irn55@mail.ru

Шкутина И. В., Стоянова О. Ф., Селеменев В. Ф., Харченко Г. Ю.

*Воронежский государственный университет
Стоянова О. Ф., к.х.н., доцент кафедры аналитической химии*

*Voronezh State University
Stoyanova O. F., Ph.D. (Chem.), Associate Professor, Department of analytic chemistry*

Селеменев В. Ф., д.х.н., проф., заведующий кафедрой аналитической химии

Selemenev V. F., Dr. Sci (Chem.), Professor, Head of the Department of Analytic Chemistry

*Воронежский государственный педагогический университет
Харченко Г. Ю., к.х.н., доцент кафедры химии*

*Voronezh State Pedagogical University
Kharchenko G. Yu., Ph.D., Associate Professor, Dept. of Chemistry*