

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СВОЙСТВ СВОБОДНОЙ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ β -ФРУКТОФУРАНОЗИДАЗЫ

Мещерякова О.Л.¹, Корнеева О.С.², Шуваева Г.П.²

¹ *Всероссийский научно-исследовательский институт комбикормовой промышленности (394026, Россия, г. Воронеж, пр. Труда, 91), e-mail: gawshina@mail.ru*

² *ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий» (394036, Россия, г. Воронеж, пр. Революции, 19), e-mail: korneeva-olgas@yandex.ru*

Проведен сравнительный анализ некоторых физико-химических свойств свободной и иммобилизованной на волокнистом ионообменнике марки ФИБАН А-6 β -фруктофуранозидазы. Исследовано влияние температуры и pH на активность свободного и иммобилизованного ферментного препарата. Установлено, что оптимальными значениями температуры и pH для свободного фермента являются 4,0 и 50 °С соответственно, тогда как для иммобилизованного ферментного препарата эти значения составили 4,0 и 70 °С соответственно. Исследована термическая и кислотная инактивации свободного и иммобилизованного фермента. Показано, что иммобилизованный фермент проявляет большую термоустойчивость по сравнению со свободным. Изучена кинетика действия и субстратная специфичность иммобилизованной β -фруктофуранозидазы *Kluyveromyces marxianus* Y-303: наблюдается увеличение значений K_m и уменьшение V_{max} по сравнению со свободным ферментом. Установлено, что иммобилизованный ферментный препарат сохраняет уровень исходной активности при 5-кратном его использовании.

Ключевые слова: β -фруктофуранозидаза, активность, адсорбционная иммобилизация, волокнистый анионит.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE PROPERTIES OF FREE AND IMMOBILIZED β -FRUKTOFURANOZIDAZY

Mescheriakova O.L.¹, Korneeva O.S.², Shuvaeva G.P.²

¹ *All-Russia Research Institute of feed industry. Pr. Labor, 91, Voronezh, 394026, Russia. E-mail: gawshina@mail.ru*

² *FGBOU VPO "Voronezh State University of Engineering Technology". Pr. Revolution, 19, Voronezh, 394036, Russia. e-mail: korneeva-olgas@yandex.ru*

A comparative analysis of some physical and chemical properties of free and immobilized in the fibrous ion exchanger grades FIBAN A-6 β -fruktofuranozidazy. The effect of temperature and pH on the activity of free and immobilized enzyme preparation. Found that the optimal values of temperature and pH for free enzyme were 4,0 and 50 ° C, respectively, whereas for the immobilized enzyme preparation, these values amounted to a 4,0 and 70 ° C, respectively. The thermal and acid inactivation of free and immobilized enzyme. It is shown that the immobilized enzyme exhibits greater thermal stability than the free. The kinetics and substrate specificity of the immobilized β -fruktofuranozidazy *Kluyveromyces marxianus* Y-303: an increase in the values of K_m and V_{max} decrease compared with the free enzyme. Found that the immobilized enzyme preparation retains the original level of activity at 5-fold using it.

Key words: β -fruktofuranozidaza, activity, adsorption immobilization, fibrous anion exchanger.

Введение

В настоящее время одной из актуальных задач биотехнологии является замена гомогенных ферментативных технологий переработки сырья на гетерогенные, т.к. при этом затраты на производство снижаются более чем на 30% [2]. Эта замена осуществляется с применением иммобилизации ферментов, так как при иммобилизации фермент становится

более стабильным за счет ограничения его способности денатурировать при изменениях pH, температуры и растворителей и может быть использован повторно [8].

В ряду гидролитических ферментов, используемых как катализаторы органических превращений, β -фруктофуранозидаза (2,1- β -D-фруктофуранозид-фруктогидролаза, К.Ф. 3.2.1.26) занимает особое место ввиду возможности ее использования в реакциях гидролиза сахарозы с целью получения инвертного сиропа, широко используемого в пищевой промышленности [3]. Инвертный сироп по своему составу и биологической ценности превосходит сахарозу, обладает хорошим влагоудерживанием, а также антикристаллизационными свойствами [4; 6]. Однако ферментативный процесс получения инвертных сиропов сопровождается рядом недостатков: нестабильность фермента, высокая стоимость, а также однократность использования. Эти недостатки можно устранить с помощью иммобилизации β -фруктофуранозидазы.

На сегодняшний день интенсивно изучаются различные методы иммобилизации β -фруктофуранозидазы, такие как физическая сорбция на гидрофобных адсорбентах, включение в гидрофобные гели и др., но свойства иммобилизованного препарата и поведение его в реакции гидролиза сахарозы не достаточно изучены.

Поэтому целью работы является проведение сравнительного анализа некоторых физико-химических свойств (термостабильности, pH-зависимости, субстратной специфичности) свободной и иммобилизованной на волокнистом ионообменнике марки ФИБАН А-6 β -фруктофуранозидазы *Kluyveromyces marxianus* Y-303 в реакции гидролиза сахарозы.

Материалы и методы исследований

В работе использовали ферментный препарат β -фруктофуранозидазы (2,1- β -D-фруктофуранозид-фруктогидролаза, К.Ф. 3.2.1.26), выделенный из культуры дрожжей *Kluyveromyces marxianus* Y-303, полученной из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ, Москва). Оживление культуры проводили по методу Коха [7] на сусло-агаре при температуре 28–30 °С в течение 5–6 дней. Культивирование дрожжей *Kl. marxianus* осуществляли глубинным способом в колбах емкостью 500 см³ в термостате, содержащих по 50 см³ питательной среды, в течение 48 часов при температуре 30 °С. В качестве питательной среды использовали дрожжевую питательную среду следующего состава, %: пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; глюкоза – 2; pH среды от 5,5 до 8,0.

Извлечение фермента из дрожжевой клетки осуществляли при помощи автолиза. Для выделения ферментного препарата использовали осаждение этанолом, фракционирование сульфатом аммония, ионообменную хроматографию на DEAE-целлюлозе, гель-

хроматографию на сефадексе G-25 и G-150. Гомогенность полученных фракций определяли модифицированным методом электрофореза в полиакриламидном геле [9].

Определение активности свободной β -фруктофуранозидазы осуществляли методом Бертрана [5] и методом Сомоджи–Нельсона [10], иммобилизованной β -фруктофуранозидазы – спектрофотометрически резорциновым методом. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализирует 1 мМ редуцирующих веществ за 1 мин в стандартных условиях.

Для иммобилизации фермента β -фруктофуранозидазы *Kluyveromyces marxianus* Y-303 использовали волокнистый ионообменник ФИБАН А-6. Подготовку ионита к иммобилизации осуществляли путем кондиционирования ионообменника и перевода его в нужную ионообменную форму. Для этого сорбент подвергали набуханию в пятикратном количестве 20%-ного раствора NaCl. Затем волокна промывали дистиллированной водой и обрабатывали 1,0%-ным раствором HCl для удаления ионов железа. Затем снова промывали дистиллированной водой и осуществляли попеременную четырехкратную обработку 0,5%-ными растворами NaOH и HCl [1]. Термоинактивацию растворимой β -фруктофуранозидазы изучали в диапазоне температур 30–80 °С. Влияние pH на активность β -фруктофуранозидазы изучали в интервале 3,0–7,0. Аналогичные исследования проводили с иммобилизованным ферментом.

Для проведения сорбционной иммобилизации β -фруктофуранозидазы 1 г носителя оставляли на ночь при комнатной температуре в 50 мл ацетатного буфера (pH 4,0), затем сливали избыточную жидкость и добавляли растворы ферментов различных концентраций (от 0,1 до 1,0 мг/см³, pH 4,0) и перемешивали в колбе с помощью электрической мешалки в течение 1,5 часов при температуре 25 °С. Количество несвязавшегося с носителем фермента определяли спектрофотометрически на СФ-46 через разные промежутки времени.

Результаты и их обсуждение

В ходе работы была проведена серия экспериментов по определению влияния температуры на активность свободной и иммобилизованной β -фруктофуранозидазы. Было установлено, что активность свободного фермента равномерно возрастает в диапазоне температур 30–50 °С, достигая максимума, равного 2700 ед/мг белка, при 50 °С (рис. 1), тогда как максимальная активность иммобилизованной β -фруктофуранозидазы, равная 1890 ед/мг белка, наблюдается при 70 °С. Резкое снижение каталитической активности свободного препарата, которое достигает нулевого значения при 80 °С, в связи с термической инактивацией фермента, наблюдается при дальнейшем повышении температуры.

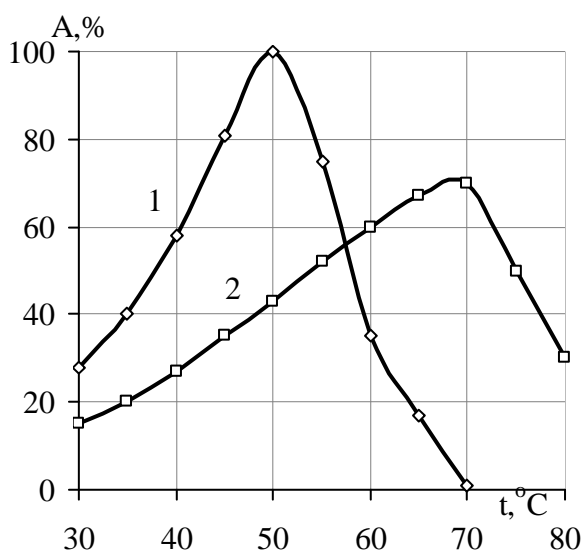


Рис. 1. Влияние температуры на каталитическую активность 1 – свободной и 2 – иммобилизованной β -фруктофуранозидазы (% от максимальной) при рН 4,0; А – активность иммобилизованной β -фруктофуранозидазы, %.

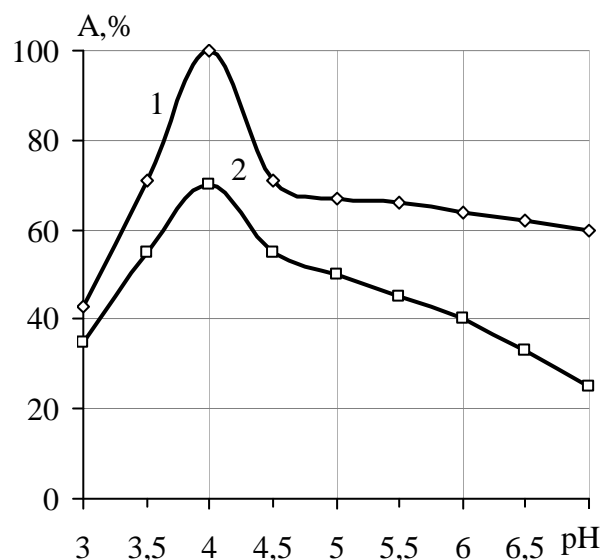


Рис. 2. Зависимость активности 1 – свободной и 2 – иммобилизованной β -фруктофуранозидазы (% от максимальной) от величины рН при температуре 50 °С; А – активность иммобилизованной β -фруктофуранозидазы, %.

Сравнительный анализ зависимости активности свободной и иммобилизованной β -фруктофуранозидазы от температуры выявил сдвиг максимума активности иммобилизованного фермента (на 20 °С) в более высокотемпературную область в сравнении со свободным ферментом. Кроме того, активность иммобилизованного фермента при удалении от температурного оптимума уменьшается медленнее, чем активность свободного, что говорит об уменьшении чувствительности адсорбированной β -фруктофуранозидазы к температурным воздействиям.

Для определения рН-оптимума действия свободного и иммобилизованного фермента гидролиз сахарозы осуществляли в интервале рН 3,0–7,0. Заданное значение рН субстрата поддерживали с помощью 0,1 М ацетатного буфера. Максимальные активности свободный и иммобилизованный ферменты проявляли при рН 4,0 (рис. 2). В интервале рН 3,0–4,0 наблюдается устойчивый рост каталитических способностей свободного и иммобилизованного ферментов с максимальными значениями активности при рН 4,0. В интервале рН 4,0–4,5 каталитические активности препаратов резко снижаются. Далее наблюдается постепенное снижение активности. Таким образом, оптимум рН иммобилизованной на волокнистом ионообменнике β -фруктофуранозидазы не отличается от рН-оптимума свободного фермента и также составляет 4,0.

Исследована зависимость скоростей ферментативной реакции гидролиза сахарозы от концентрации субстрата β -фруктофуранозидазой *Kl. marxianus*, иммобилизованной адсорбционно на носителе ФИБАН А-6 и свободного фермента (рис. 3).

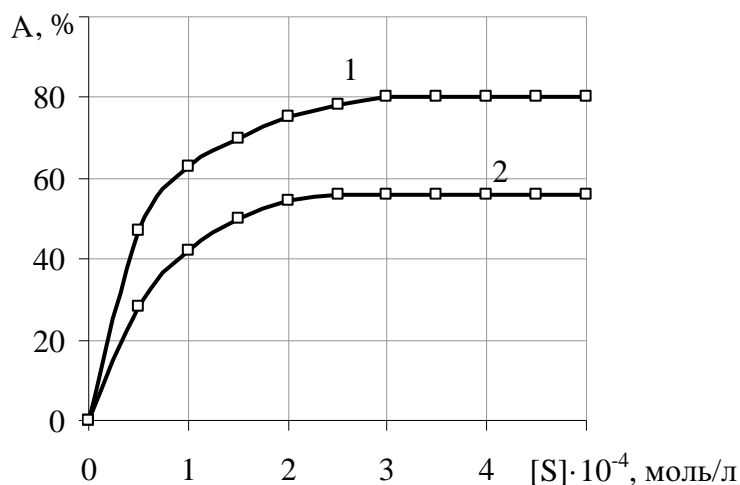


Рис. 3. Зависимость каталитической активности 1 – свободной и 2 - иммобилизованной β -фруктофуранозидазы от концентрации субстрата.

Анализируя рис. 3, можно предположить, что при адсорбции белка на носителе происходит увеличение жесткости третичной структуры, ответственной за превращение молекул субстрата, а также имеются затруднения, связанные с переходом иммобилизованного фермента из неравновесного состояния в равновесное по сравнению со свободной β -фруктофуранозидазой и удлинение лимитирующей стадии ферментативного катализа. С помощью преобразования кривых зависимости V от S в координатах Лайнуивера–Берка были определены K_m и V_{max} реакции гидролиза сахарозы β -фруктофуранозидазой, иммобилизованной на ФИБАН А-6 (табл. 1).

Таблица 1

β-фруктофуранозидаза	K_m, моль/л	V_{max}, мкмоль·мг/мин
Свободная	$2,24 \cdot 10^{-4}$	$102 \pm 0,9$
Иммобилизованная	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$35 \pm 0,9$

Сравнительный анализ кривых $A(S)$ и значений основных кинетических параметров реакций гидролиза сахарозы позволяют сделать вывод, что иммобилизованная β -фруктофуранозидаза проявляет сродство к субстрату, и происходит увеличение значений K_m и V_{max} . Очевидно ионообменное волокно ФИБАН А-6 достаточно прочно

связывается с β -фруктофуранозидазой, обеспечивая более высокую термо- и рН-стабильность белка, при этом незначительно меняется конформация субъединиц белка, т. к. иммобилизованный фермент проявляет достаточно высокую каталитическую способность после взаимодействия с матрицей волокна.

Кроме того, изучали совместное действие рН и температуры на активность свободной β -фруктофуранозидазы. Было установлено, что при температуре 40 °С и рН 4,0 в течение 72 мин. сохранялось 100% активности фермента, тогда как при величине рН 3,0; 5,0 и 6,0 к этому времени активность свободного фермента составила 50, 34 и 15% соответственно. При температуре 50 °С и рН 3,0; 4,0; 5,0 и 6,0 после 2 ч инкубации остаточная активность составила 73, 87, 63 и 37% соответственно. Повышение температуры до 60 °С приводило к более резкой инактивации фермента. Данные по влиянию температуры и рН на константу скорости инактивации свободного фермента представлены в таблице 2.

Таблица 2

Температура, °С	К (ч ⁻¹) при рН			
	3,0	4,0	5,0	6,0
30	0,006	0,002	0,007	0,009
40	0,013	0,004	0,017	0,026
50	0,100	0,068	0,160	0,240
60	1,100	0,875	1,800	2,310

Для исследования термической инактивации иммобилизованной β -фруктофуранозидазы проводили определение остаточной активности фермента при температурах 50–80 °С (рис. 4). Обнаружено, что остаточная активность иммобилизованного фермента при 70 °С после 60 мин. инкубации составила 53% от начальной. Нагревание фермента при 80 °С в течение 60 мин. приводит к неполной инактивации иммобилизованного фермента: он сохраняет 2% каталитической активности. Наблюдаемое увеличение термостабильности объясняется тем, что при взаимодействии тепловой энергии на иммобилизованную β -фруктофуранозидазу при температурах от 60 до 70 °С разрушение гидрофобных взаимодействий и других слабых связей не имеет места, что свидетельствует о более высокой термоустойчивости иммобилизованного фермента по сравнению со свободным: константы скорости инактивации для иммобилизованного препарата β -фруктофуранозидазы при любой температуре будут ниже, чем для свободного фермента. Значения констант скорости термической инактивации иммобилизованной на ФИБАН А-6 β -фруктофуранозидазы представлены в таблице 3.

Таблица 3

Температура, °С	Константа скорости инактивации, ч ⁻¹
50	1,01
60	1,06
70	0,45
80	2,51

Также была исследована кратность использования фермента, иммобилизованного на ФИБАН А-6. Установили, что иммобилизованная β -фруктофуранозидаза сохраняет высокую активность при многократном использовании (4–5 раз) (рис. 5).

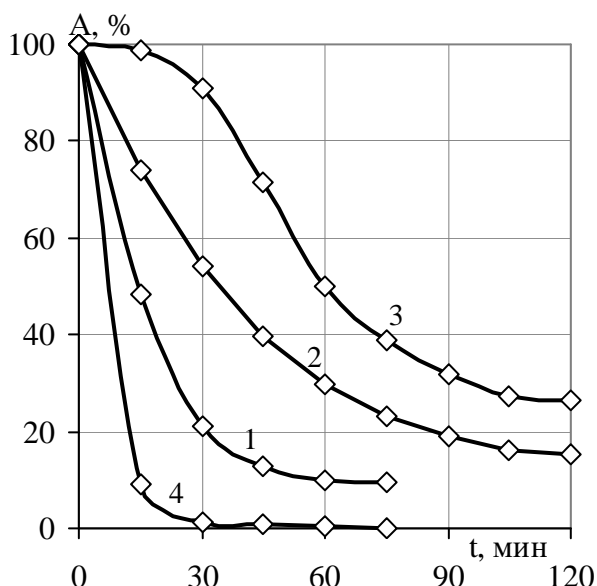


Рис. 4. Зависимость каталитической активности иммобилизованной β -фруктофуранозидазы от времени термической инактивации: А – активность (% от максимальной); t – время инкубирования, мин.; 1 – при 50 °С; 2 – при 60 °С; 3 – при 70 °С; 4 – при 80 °С.

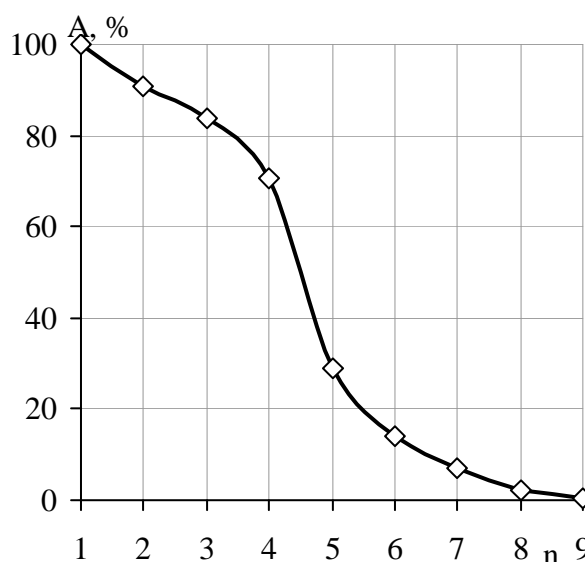


Рис. 5. Кратность использования иммобилизованной β -фруктофуранозидазы: А – активность, ед/мг белка (% от максимальной); n – число реакций гидролиза сахарозы.

Выводы

Сравнительный анализ свойств свободной и иммобилизованной на волокнистом ионообменнике марки ФИБАН А-6 β -фруктофуранозидазы показал, что в результате иммобилизации температурный оптимум сдвигается в сторону увеличения температур, что обусловлено конформационными изменениями молекулы фермента, рН-оптимум для свободной и иммобилизованной β -фруктофуранозидазы составляет 4,0. Результаты

исследования термоинактивации β -фруктофуранозидазы свидетельствуют о более высокой термоустойчивости иммобилизованного фермента по сравнению со свободным. Исследована кинетика действия и субстратная специфичность иммобилизованной β -фруктофуранозидазы *Kluveromyces marxianus* Y-303: наблюдается увеличение значений K_m и уменьшение V_{max} по сравнению со свободным ферментом. Кроме того, увеличивается стабильность фермента во времени и кратность его использования в процессе проведения гидролиза сахарозы с целью получения инвертных сиропов.

Список литературы

1. ГОСТ 10896-78. Иониты. Подготовка к испытанию.
2. Иммобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы : в 2 т. / под ред. И.В. Березина, В.К. Антонова, К. Мартинек. – М. : Изд-во МГУ, 1976. – Т. 1. – 296 с.
3. Корнеева О.С. Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды. – Воронеж : ВГУ, 2001. – 183 с.
4. Кретович В.Л. Основы биохимии растений. – М. : Высшая школа, 1986. – 547 с.
5. Методы биохимических исследований растений / под ред. А.И. Ермакова. – 3-е изд. перераб. и доп. – Л. : Агропромиздат. Ленингр. отд., 1976. – 430 с.
6. Патент РФ № 2231557/00, 27.06.2004.
7. Слюсаренко Т.П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств. – М. : Легкая пром-ть, 1984. – 208 с.
8. Тривен М. Иммобилизованные ферменты. – М. : Мир, 1983. – 213 с.
9. Davies R. A new factor stimulating invertase production by *Saccharomyces fragilis* / R. Davies // J. Gen. Microbiol. – 1971. – Vol. 66. – № 1. – P. 37-39.
10. Somogyi M.J. Determination of reducing sugar // J. Biol. Chem. – 1952. – Vol. 195. – № 1. – P. 19-28.

Рецензенты

Грабович М.Ю., д.б.н., доцент, профессор кафедры биохимии и физиологии клетки. ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет» Министерства образования и науки РФ, г. Воронеж.

Глотова И.А., д.т.н., профессор, зав. кафедрой технологии переработки животноводческой продукции ФГОУ ВПО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I» Министерства образования и науки РФ, г. Воронеж.