

УДК 663.53

В.Н. Леонтьев, доцент; Т.М. Кривенкова, студент;
К.М. Белявский, директор РУП «МБИ»

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

The comparative analysis of amylolytic enzyme preparations has done. It was found that properties of enzymes from "Enzyme" (Belarus) and "Novo Nordisk" (Denmark) are identicals.

В настоящее время в ряде передовых зарубежных государств освоено промышленное производство высокоочищенных амилолитических ферментов с целью их применения для осахаривания крахмала при получении глюкозы медицинского и пищевого назначения, глюкозо-фруктозных сиропов, сорбита как диетического заменителя сахара и основы для производства аскорбиновой кислоты. Наряду с этим, в мировой практике высокоочищенные амилолитические препараты используются в текстильной промышленности в качестве добавок, улучшающих качество тканей при окрашивании, в пивоваренной и спиртовой промышленности как заменитель солода и т.д.

Исследование амилолитических ферментных препаратов актуально в нашей республике прежде всего для обеспечения потребности осваиваемого в 2000 году в г. Дрогичин на БТП «Эксон» промышленного производства кристаллической глюкозы. Кроме этого, крупнотоннажными потребителями являются предприятия по производству этилового спирта, входящие в ОАО «Кристалл», на которых данные препараты могут быть использованы для осахаривания крахмалсодержащего сырья. Потенциальными потребителями являются текстильные предприятия концерна «Беллепром», где предусматривается их использование для обработки тканей при окрашивании.

Ферменты называют амилолитическими от латинского слова «амилум», что означает крахмал. К этой группе относятся не только ферменты, разлагающие крахмал, но и ферменты, завершающие этот процесс, доводя его до образования элементарных компонентов. К используемым в практике амилолитическим ферментам относятся α -амилаза, β -амилаза, амилоглюкозидаза (глюкоамилаза), амило-1,6-глюкозидаза. Каждый из этих ферментов характеризуется специфическим воздействием на крахмал [1].

В частности, глюкоамилаза атакует олигосахариды, начиная от нередуцирующего конца молекулы, последовательно расщепляя α -1,4, α -1,6 и α -1,3 глюкозидные связи, причем скорость гидролиза α -1,4 связей в 15 раз выше, чем α -1,6 связей, и в 28 раз выше, чем α -1,3 связей.

Единственным продуктом гидролиза на всех стадиях является β -глюкоза.

Следует отметить, что за последнее время все более отчетливо проявляется интерес к кислотостабильным и термостабильным ферментным препаратам амилаз. Все это имеет ряд конкретных объяснений. Так, при ферментативном получении кристаллической глюкозы или спирта гидролиз крахмалистого сырья осуществляется амилазами при pH от 4,5 до 6,5 и температуре 45–55°C в зависимости от источника фермента. Однако в условиях высокой концентрации глюкозы и других низкомолекулярных сахаров практически неизбежно бактериальное заражение, которое существенно снижает выход глюкозы и соответственно спирта. Избежать или существенно уменьшить возможность микробного заражения можно повысив температуру реакционной среды до 65 – 70°C или понизив кислотность до pH 2,5 – 3,0 [2].

Лидером в производстве амилолитических ферментных препаратов является фирма Novo Nordisk (Дания). У нас в республике производством ферментных препаратов, обладающих глюкоамилазной активностью, занимается ОАО «Белмедпрепараты» (г. Минск) и РУП «Энзим» (г. Пинск).

Нам была предоставлена возможность изучить свойства отечественного ферментного препарата амилоглюкаваморин Г20х (РУП «Энзим») и сравнить его с импортным AMG 300L (Novo Nordisk).

Оба ферментных препарата обладают глюкоамилазной активностью 1300 ед/мл и действуют на 1,4- и 1,6-альфа связи в разжиженном крахмале. Фирма Novo Nordisk характеризует свою продукцию следующими показателями: оптимальная температура – 75°C, оптимальный рН – 4,5, стабильность функционирования фермента при различных температурах и рН.

Нами были исследованы и описаны следующие характеристики пинского ферментного препарата амилоглюкаваморин Г20х: оптимумы температуры и рН, исследована его стабильность, найдена оптимальная концентрация, определены состав и молекулярная масса компонентов ферментного препарата.

Для определения концентрации белка использовали биуретовый микрометод [3].

Анализ показал, что содержание белка в ультраконцентрате ферментного препарата амилоглюкаваморин Г20х составляет 80 мг/мл.

Поскольку ферментный препарат проявляет свою активность при повышенной температуре, изучили влияние температуры на активность. При этом использовали метод определения глюкоамилазной активности [4]. Результаты исследования представлены на рис. 1.

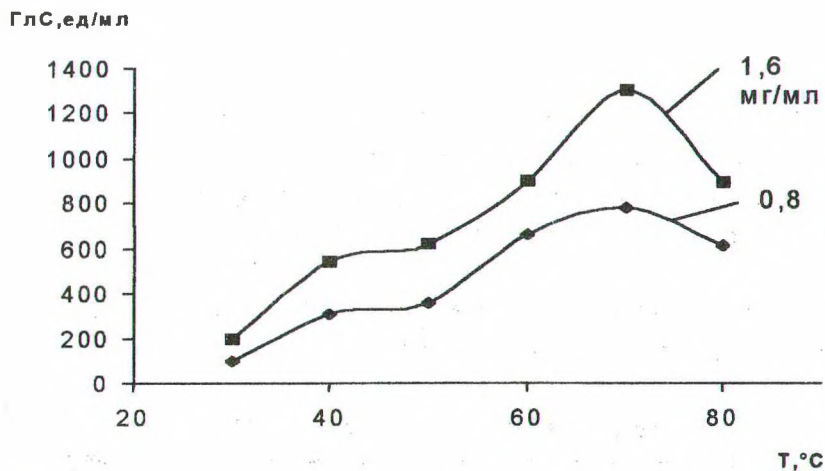


Рис. 1. Зависимость активности отечественного ферментного препарата от температуры

Как видно из рис. 1, максимальная активность фермента наблюдается при 70°C как при концентрации белка 0,8 мг/мл, так и при концентрации 1,6 мг/мл. Поэтому в дальнейших исследованиях использовали температуру 70°C. Активность при концентрации 0,8 мг/мл была выше на 1/3, чем при концентрации 1,6 мг/мл.

В связи с этим следующим этапом явилось изучение зависимости активности ферментного препарата от концентрации белка. Полученные результаты представлены графически на рис. 2.

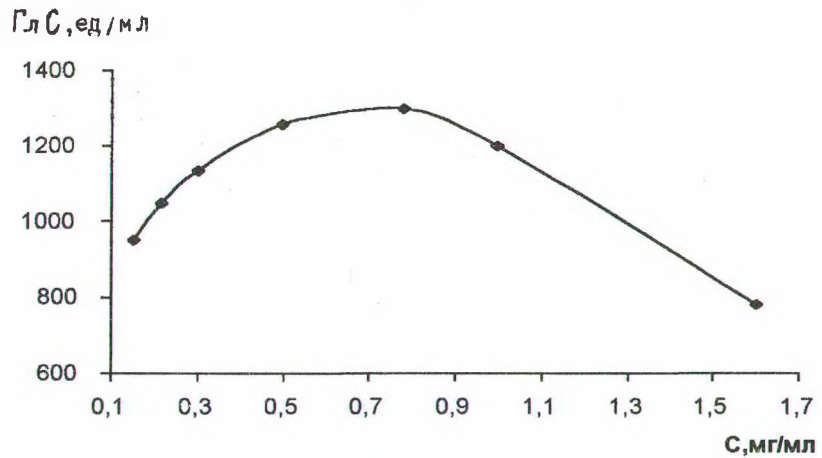


Рис. 2. Зависимость активности ферментного препарата от концентрации белка в реакционной смеси ($T=70^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=4,5$)

Как следует из рис.2, максимальную активность ферментный препарат проявляет при концентрации белка 0,8 мг/мл. При этом следует обратить внимание на то, что активность фермента мало изменяется при концентрации белка от 0,6 до 0,9 мг/мл, что выгодно использовать при изучении свойств ферментного препарата. Падение активности при увеличении концентрации белка, на наш взгляд, может быть обусловлено ассоциацией молекул фермента, приводящей к конформационным изменениям, вследствие чего ухудшается доступность активных центров фермента молекулам субстрата.

Следующим этапом являлись исследования зависимости активности ферментного препарата от pH. Чтобы минимизировать влияние состава буферного раствора и измерить активность в широком диапазоне pH, использовали фосфатно-ацетатный буферный раствор (0,1 М по фосфату) с pH от 3 до 8. Результаты измерений представлены на рис. 3.

Из рис. 3 видно, что максимальная активность наблюдается при pH 4,5, поэтому все измерения глюкоамилазной активности проводили при pH 4,5.

При исследовании стабильности ферментного препарата при 70°C , pH 4,5 было обнаружено, что время потери 50% активности составляет 240 мин (рис.4).

Сравнение полученных результатов с данными, предоставленными фирмой Novo Nordisk, показывает, что оба ферментных препарата имеют одинаковое оптимальное значение pH – 4,5, импортный препарат – на 5°C более высокую оптимальную температуру (75°C), но активность импортного препарата при 70°C падает на 50% уже за 75 мин, из чего следует, что отечественный ферментный препарат амилоглюкаваморин Г20х обладает большей термостабильностью.

Из литературных данных известно, что глюкоамилаза способна расщеплять не только α -1,4 гликозидные связи крахмала, но и α -1,6 связи декстрана [5]. В связи с этим представлялось целесообразным изучить возможность гидролиза α -1,6 гликозидных связей декстрана отечественным ферментным препаратом амилоглюкавамоорином Г20х. Поскольку такой гидролиз протекает как последовательное отщепление остатков глюкозы с нередуцирующего конца молекулы полисахарида, то за ходом гидролиза можно наблюдать по увеличению концентрации глюкозы в реакционной среде.

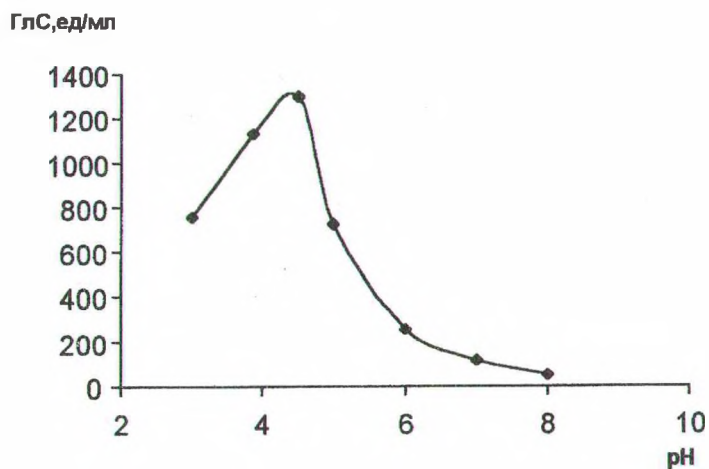


Рис. 3. Зависимость активности ферментного препарата от рН
($T=70^{\circ}\text{C}$, $C=0,8$ мг/мл)

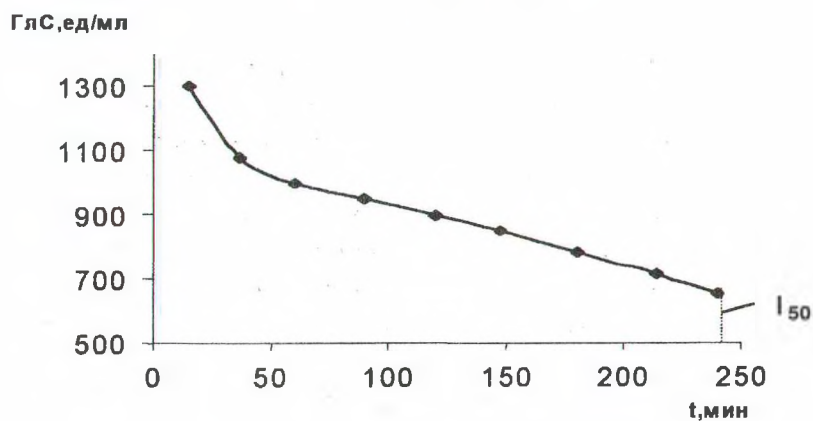


Рис. 4. Стабильность ферментного препарата во времени
($T=70^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=4,5$, $C=0,8$ мг/мл)

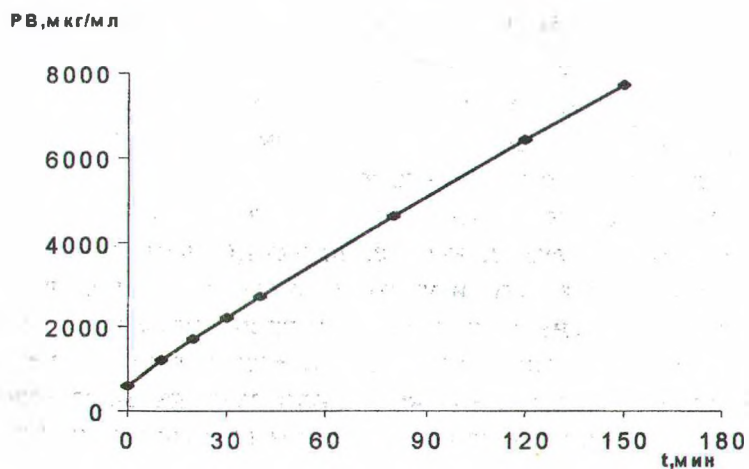


Рис. 5. Накопление РВ при ферментативном гидролизе декстрана Т20

В качестве аналитического метода определения глюкозы был выбран метод Миллера [6]. Результаты представлены на рис. 5.

Из рис.5 видно, что гидролиз декстрана протекает достаточно эффективно и кинетика реакции линейна. Из графика легко рассчитать скорость гидролиза декстрана T20, которая составляет 50 нмоль глюкозы/(мин*мг белка). Исследование гидролиза крахмала в аналогичных условиях (рис. 6) показало, что скорость гидролиза составляет 500 нмоль глюкозы/(мин*мг белка).

Таким образом, α -1,6 гликозидные связи, как и следовало ожидать, гидролизуются существенно медленнее, чем α -1,4 связи.

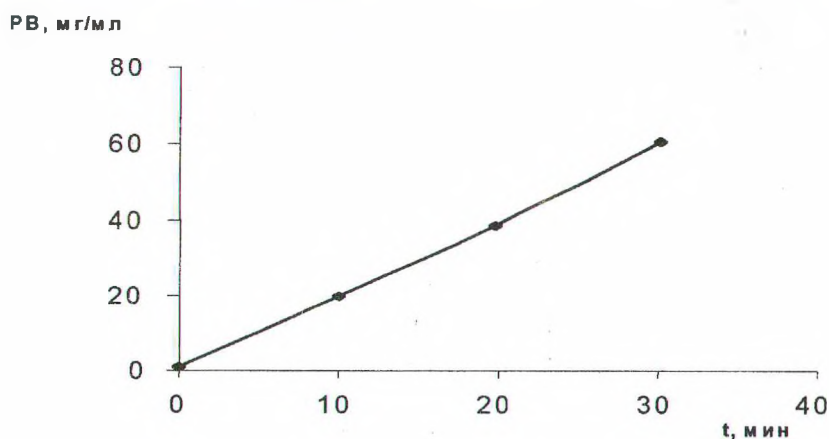
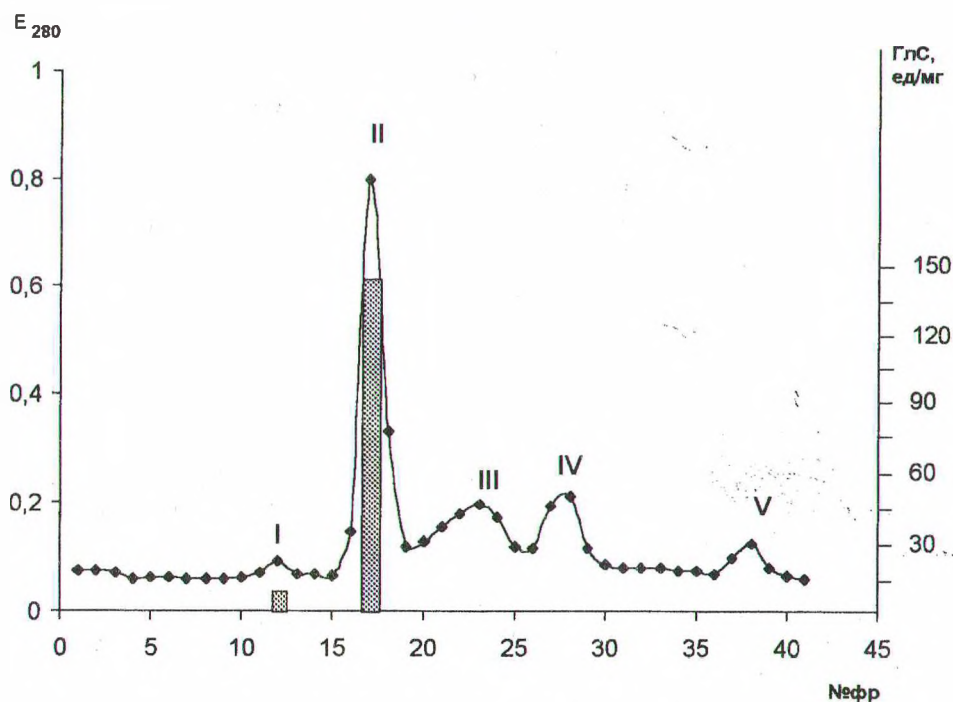


Рис. 6. Накопление РВ при ферментативном гидролизе растворимого крахмала



Колонка 1,2x75 см, элюент: 0,1М ацетатный буфер pH 4,5, скорость элюирования 1мл/(мин*см²), объем фракции 2,3 мл

Рис. 7. Гель-хроматограмма ферментного препарата

Логическим завершением данного этапа работы явилось исследование состава ферментного препарата и определение молекулярных масс составляющих его белков с помощью метода гель-хроматографии. Профиль элюирования представлен на рис 7.

Из рис.7 видно, что ферментный препарат состоит из 4 различных полипептидов с молекулярными массами 74, 55, 38, 5 кДа. Исследование глюкоамилазной активности во фракциях, содержащих максимальное количество белка в II, III, IV, V хроматографических пиках, показало, что только пик II обладает данной ферментативной активностью. Некоторая активность обнаружена во фракции 13, которая представляет собой высокомолекулярный комплекс с молекулярной массой не менее 700 кДа, вышедшей в свободном объеме колонки.

Таким образом, согласно полученным данным, а также литературным источникам [7,8] можно сказать, что в состав ферментного препарата амилоглюкаваморин Г20х входит глюкоамилаза с молекулярной массой 74 кДа (пик II). α -амилазе, на наш взгляд, соответствует пик IV с молекулярной массой 38 кДа [9,10].

Проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Установлены оптимальные значения температуры – 70°C, pH – 4,5, концентрации белка – 0,8 мг/мл при концентрации субстрата 2%.
2. Установлено, что ферментный препарат амилоглюкаваморин Г20х обладает более высокой термостабильностью, чем препарат датской фирмы.
3. При оптимальных условиях 50% активности препарат теряет за 240 мин.
4. Ферментный препарат состоит из четырех различных белков с молекулярными массами 74, 55, 35, 5 кДа.
5. Препарат расщепляет α -1,4 гликозидные связи (крахмал) со скоростью 500 нмоль глюкозы/(мин*мг белка) и α -1,6 гликозидные связи (декстран Т20) со скоростью 15 нмоль глюкозы/(мин*мг белка).
6. Установлено, что глюкоамилаза имеет молекулярную массу 74 кДа.

Таким образом, освоение производства амилоглюкаваморина Г20х позволит полностью удовлетворить потребность отечественных предприятий в ферментных препаратах, обладающих глюкоамилазной активностью, и полностью исключить импорт данной продукции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Общая органическая химия / Под ред. Н.К. Кочеткова. Т.11. – М.: Химия, 1986. – С. 234–238.
2. Квеситадзе Г.И. Грибные и бактериальные амилазы. – Тбилиси: Мецниереба, 1984. – С. 34, 66-69, 79, 89.
3. Практическая химия белка / Под ред. А. Дарбре. – М.: Мир, 1989. – С. 296.
4. ГОСТ 20264.4-89. Препараты ферментные. Методы определения амилазной активности. Госстандарт СССР. – М.: Госкомитет СССР по стандартам, 1989. – С. 146–152.
5. Крахмал и крахмалопродукты / Под ред. Н.Г. Гулюка. – М.: Агропромиздат, 1985. – С. 132–159.
6. Лявонцьёў В.М., Беясава Н.А. Біяхімія і малекулярная біялогія. Метадычныя ўказанні да лабараторных заняткаў па аднайменнаму курсу. – Мн.: БТІ імя С.М. Кірава, 1991. – С. 37–38.
7. Микробные ферменты и биотехнология / Под ред. В.М. Фогарти. – М.: Агропромиздат, 1986. – С. 26–34.

8. Hayshida S. // *Agricultural and Biological Chemistry*. – 1975. – V. 39. – P. 2093.
9. Yamasaki Y., Suzuki Y., Ozawa J. // *Agricultural and Biological Chemistry*. – 1977. – V. 49. – P. 2149.
10. Spencer-Martins I., van Uden N. // *European Journal of Applied Microbiology and Biothechnology*. – 1979. – V. 6. – P. 241.

УДК 579.861; 576.8

И.М. Бурак, аспирант; В.Н. Леонтьев, доцент; Т.И. Ахрамович, ассистент;
Н.В. Сухова, студент

ВЛИЯНИЕ АТОМА ХЛОРА В МОЛЕКУЛЕ СУБСТРАТА НА АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМ Р450-СОДЕРЖАЩЕЙ ОКСИГЕНАЗНОЙ ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

The influence of atom Cl in the structure of organic substrat on the activity of cytochome P450 containing monooxygenase of bacteria genus *Pseudomonas* was investigated.

Вопросам биодegradации загрязнителей окружающей среды посвящено немало литературы. Большую группу загрязнителей представляют собой гидрофобные органические вещества, попадающие в биосферу в результате хозяйственной деятельности человека. Зачастую микробиологический путь разложения таких ксенобиотиков включает в себя аэробные процессы, к осуществлению которых способны микроорганизмы, обладающие оксигеназной ферментной системой. Монооксигеназы и диоксигеназы, являющиеся обязательными компонентами таких систем, внедряют соответственно один или два атома кислорода в молекулу субстрата, чаще всего в виде гидроксильных групп. Такая первоначальная модификация гидрофобных ксенобиотиков увеличивает их гидрофильность, облегчает их последующую утилизацию и является одной из первых стадий их метаболизма [1].

Оксигеназные ферментные системы бактерий весьма разнообразны по количеству и типам включающих в себя ферментов. Очень часто в их состав в качестве терминальной оксидазы входит уникальный гемопротеин – цитохром Р450, являющийся гемопротеином b-типа. В присутствии доноров электронов (НАД(Ф)Н·Н⁺) цитохром Р450 способен активировать молекулярный кислород, один атом которого затем внедряется в молекулу окисляемого субстрата, а другой восстанавливается до воды. Оксигеназные реакции, катализируемые цитохромом Р450, весьма разнообразны. Это реакции окислительного дезалкилирования, гидроксилирования алифатических, ароматических, гетероциклических углеводов, N-окисления и многие другие [2].

Ранее было показано, что такие загрязнители, как гербициды прометрин и симазин, способны деградироваться специально отобранными штаммами бактерий рода *Pseudomonas*, которые утилизируют их в качестве единственного источника углерода и энергии [3]. В связи с тем, что прометрин и симазин, являющиеся гидрофобными соединениями, подвергаются деградации в аэробных условиях, представлялось интересным изучить биохимические основы их метаболизма.

На первом этапе проводили определение содержания цитохромов b₅ и Р450 в клетках бактерий *Pseudomonas aurantica* В-162 и *Pseudomonas aeruginosa* В-7, выращенных на среде с симaziном и прометрином соответственно.