

Н.Е. КУЛИКОВА, А.Г. ЧЕРНОБРОВИНА,
Н.Н. РОЕВА, О.Ю. ПОПОВА

Исследования конформационных изменений в молекуле фермента под действием тепловой обработки в присутствии ионов некоторых металлов

*Тепловая обработка ферментных препаратов приводит к заметному изменению их активности в результате определенных конформационных изменений в молекуле фермента. На основе изучения ультрафиолетовых спектров авторы судят об изменении полярности окружения остатков триптофана при добавлении ионов цинка, алюминия и кальция. В работе приведены результаты изучения спектров флуоресценции ферментного препарата – ультраконцентрата глюкоамилазы *Asp. awamori* после тепловой обработки и добавления ионов некоторых металлов для обнаружения структурных изменений в молекуле фермента при этих воздействиях. Установлено, что совместное влияние ионов металлов и теплового воздействия на водный раствор ферментного препарата ультраконцентрата глюкоамилазы *Asp. awamori* приводит к повышению интенсивности свечения и смещению λ_{\max} в спектрах флуоресценции ультраконцентрата глюкоамилазы *Asp. awamori* в область более коротких длин волн. Это указывает на увеличение гидрофобности окружения триптофана и подтверждает конформационные изменения в молекуле фермента, происходящие под действием ионов некоторых металлов и при тепловом воздействии.*

Ключевые слова: конформационные изменения, ферментные препараты, спектры флуоресценции.

Influence of heat treatment in the presence of certain metal ions on the spectral-fluorescent properties of an amylolytic enzyme preparation. N.E. KULIKOVA, A.G. CHERNOBROVINA, N.N. ROEVA (Moscow State University of Food Production, Moscow), O.Yu. POPOVA (International Technological College of Moscow State University of Food Production, Moscow).

*The heat treatment of enzyme preparations leads to a noticeable change in their activity as a result of certain conformational changes in the enzyme molecule. On mastering the study of ultraviolet spectra, the authors judge a change in the polarity of the environment of tryptophan residues with the addition of zinc, aluminum and calcium ions. The paper presents the results of studying the fluorescence spectra of an enzyme preparation: glucoamylase ultraconcentrate *Asp. awamori* after heat treatment and the addition of certain ions of some metals to detect structural changes in the enzyme molecule under these influences. It was found that the combined effect of metal ions and thermal effects on the aqueous solution of the enzyme preparation of glucoamylase ultraconcentrate *Asp. awamori*, leads to an increase in luminescence intensity and a shift of λ_{\max} in the fluorescence spectra of *Asp. awamori* glucoamylase ultraconcentrate to the region of shorter wavelengths. This indicates an increase in the hydrophobicity of the tryptophan environment and provides confirmation of conformational changes in the enzyme molecule under the action of ions of certain metals and upon thermal exposure.*

Key words: conformational changes, enzyme preparations, fluorescence spectra.

*КУЛИКОВА Наталья Евгеньевна – кандидат технических наук, доцент, ЧЕРНОБРОВИНА Антонина Григорьевна – кандидат технических наук, доцент, РОЕВА Наталья Николаевна – доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой (Московский государственный университет пищевых производств, Москва), ПОПОВА Ольга Юрьевна – преподаватель (Международный технологический колледж, Москва).

*E-mail: nataliyakulikova67@mail.ru

Введение

В последнее время сохраняют актуальность исследования по применению ферментных препаратов в различных областях пищевой и перерабатывающей промышленности: спиртовой, хлебопекарной, пивоваренной, винодельческой и др.; в кожевенном и текстильном производстве; в сельском хозяйстве и при получении синтетических моющих средств. Однако их применение в настоящее время ограничено вследствие дефицитности и достаточно высокой стоимости. Ведутся исследования по разработке наиболее дешевых сред для выращивания микроорганизмов – продуцентов ферментов, ищутся условия культивирования, совершенствуются способы выделения и очистки препаратов.

С другой стороны, уменьшения себестоимости целевых продуктов, полученных с применением ферментных препаратов, можно достичь путем повышения активности ферментного препарата, тем самым получить возможность снизить дозировку вносимого фермента без ухудшения качества продукции. Одним из путей снижения расхода ферментных препаратов является предварительная температурная обработка в присутствии ионов некоторых металлов.

Данное повышение активности происходит в связи с тем, что каталитические свойства и механизм действия ферментов обусловлены определенной структурной организацией макромолекулы ферментного белка и активного центра фермента [15]. Причем активный центр не изолирован от всей молекулы фермента, и различные типы взаимодействий охватывают ее в целом [15].

При некоторых физико-химических воздействиях (температуры, облучения, химических реагентов, электромагнитных полей и др.) стабилизированные и неупорядоченные участки макроструктуры белка могут обратимо изменять свою конформацию. Причем подобные обратимые изменения, или, как их называют, конформационные флуктуации, играют важную роль в регулировании ферментативных процессов [8, 13, 16].

По современным представлениям структура и функции белковых молекул определяются сочетанием подвижности и жесткости. Жесткость пространственной структуры обеспечивается водородными связями, гидрофобными взаимодействиями. Подвижность связана с возможностью пребывания молекулы белка в нескольких упорядоченных конформационных состояниях, мало различающихся по свободной энергии. Между ними возможны конформационные переходы – при изменении факторов среды, взаимодействии белков с субстратами, комплексообразовании, ассоциации субъединиц. В частности, к конформационным изменениям может приводить специфическое связывание ионов металлов молекулой белка [8, 13, 16].

Для исследования конформационных переходов и их зависимости от различных факторов можно использовать методы флуоресцентной спектроскопии. Известно, что белки, характеризующиеся высокой кооперативностью, подвергаются превращениям при относительно малом изменении возмущающей переменной. Энергетическим переходам между отдельными электронными, колебательными и вращательными уровнями соответствуют кванты энергии, значительно различающиеся по величине и, следовательно, по частоте, и поэтому электронные, колебательные и вращательные спектры молекул располагаются в различных спектральных областях [2, 6].

Принято подразделять белки по их флуоресцентным свойствам на три класса: 1 класс содержит триптофан, тирозин, фенилаланин, 2 класс – тирозин и фенилаланин, 3 класс – фенилаланин. При использовании метода флуоресцентного анализа наибольшую информацию о структуре белка (вторичной, третичной) из трех аминокислот дают остатки триптофана, которые имеют три формы. Одна форма – триптофанил, расположенный внутри белковой молекулы в низкополярном гидрофобном окружении. Он характеризуется коротковолновым максимумом флуоресценции (330–350 нм) и низким квантовым выходом (0,07–0,09). Другая форма – триптофанил, расположенный на поверхности белковой молекулы в высокополярном гидрофильном окружении, максимум флуоресценции 350 нм,

квантовый выход 0,20. Третья форма присуща большинству нативных белков, к ней принадлежат такие фиксированные поверхностные остатки триптофана, взаимодействие которых лимитировано какими-то факторами на поверхности макромолекулы; максимум флуоресценции 340–342 нм, квантовый выход больше 0,20 [1, 6].

Цель настоящих исследований – изучение влияния тепловой обработки в присутствии ионов некоторых металлов на спектрально-флуоресцентные свойства ферментного препарата амилолитического действия.

Объекты и методы исследования

Объектом исследований послужил ферментный препарат амилолитического действия – ультраконцентрат глюкоамилазы *Asp. awamori*, разработанный во Всероссийском научно-исследовательском институте пищевой биотехнологии (филиал Федерального исследовательского центра питания и биотехнологии), в настоящее время не является промышленным ферментным препаратом. В связи с этим представляло интерес изучить спектры флуоресценции нового ферментного препарата после тепловой активации в присутствии ионов некоторых металлов.

Тепловую обработку 0,1%-х растворов ультраконцентрата глюкоамилазы *Asp. awamori* проводили при температуре 50 °С в течение 20 мин в ультратермостате [3, 4, 7, 10, 12].

Глюкоамилазную активность (ГЛА) определяли глюкозооксидазным методом, основанным на специфическом определении глюкозы, образующейся при действии глюкоамилазы на растворимый крахмал [5]. Фермент глюкозооксидаза является катализатором окисления глюкозы кислородом воздуха до глюконовой кислоты. Второй продукт реакции – пероксид водорода. Оба конечных продукта реакции образуются в количествах, эквивалентных окисленной глюкозе.

Пероксид водорода под влиянием фермента пероксидазы окисляет гексацианоферрат (II) калия, который переходит в гексацианоферрат (III), окрашенный в лимонно-желтый цвет. Интенсивность окраски измеряли на СФ-26 при толщине слоя 10 мм, $\lambda = 430$ нм.

За единицу глюкоамилазной активности принято такое количество фермента, которое, действуя на растворимый крахмал при температуре 30 °С и рН 4,7 в течение 1 мин, освобождает 1 микромоль глюкозы. Глюкоамилазную активность рассчитывали по эмпирическим уравнениям, используя градуировочную кривую по глюкозе [5, 11].

Результаты и обсуждение

Собственную флуоресценцию регистрировали на спектрофлуориметре СМ-2203, спектральный диапазон составил 280–420 нм. Как видно на рис. 1, спектр собственной флуоресценции 0,1%-го ультраконцентрата глюкоамилазы *Asp. awamori* имеет максимум при длине волны 330–350 нм. Известно, что одним из основных флуоресцирующих хромофоров ферментного препарата являются остатки триптофана [1, 2].

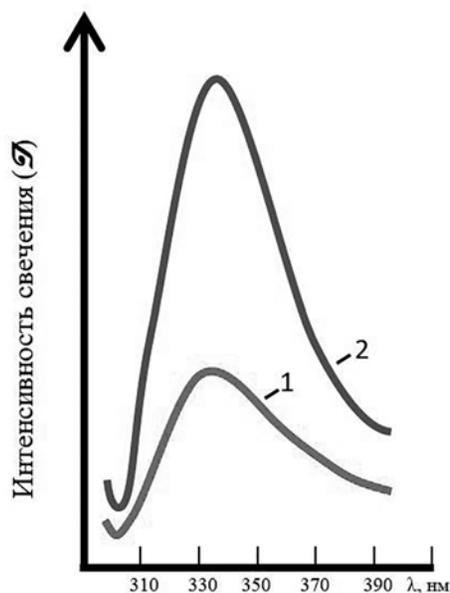


Рис. 1. Спектры собственной флуоресценции: 1 – ультраконцентрата глюкоамилазы *Asp. Awamori*, 2 – ультраконцентрата глюкоамилазы *Asp. awamori* после тепловой обработки

Максимум спектра флуоресценции при длине волны 330–332 нм дает одна из форм остатка триптофана – триптофанил, расположенный внутри белковой молекулы в низкополярном гидрофобном окружении [6, 8].

Тепловая обработка водного раствора ультраконцентрата глюкоамилазы *Asp. awamori* при оптимальных условиях увеличивает каталитическую активность ферментного препарата на 30 %. В спектре собственной флуоресценции ультраконцентрата глюкоамилазы *Asp. awamori* после тепловой обработки (рис. 1) значительно возрастает интенсивность флуоресценции, т.е. повышению глюкоамилазной активности соответствует увеличение интенсивности флуоресценции.

Известно, что добавление ионов различных металлов способствует повышению каталитической активности ферментных препаратов или, наоборот, приводит к инактивации ферментного препарата [3, 4, 14]. Глюкоамилаза – не металлофермент, поэтому добавление ионов кальция и магния не оказывает какого-либо воздействия на глюкоамилазную активность, хотя наблюдается некоторое повышение каталитической активности данного фермента в результате предварительной обработки растворов глюкоамилазы ионами железа и цинка [4, 12, 14]. Это связано с образованием активных и устойчивых форм глюкоамилаз, а также сохранением активной конформации молекулы фермента.

Для изучения влияния ионов Pb^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} на спектры флуоресценции ультраконцентрата глюкоамилазы *Asp. awamori* хлориды данных металлов добавляли к раствору ферментного препарата в концентрациях 10^{-5} – 10^{-6} моль/л. Добавление ионов металлов в данной концентрации не оказывает негативное влияние на организм человека, что особенно важно для ферментов препаратов, используемых в пищевой промышленности. После 20-минутной инкубации при температуре 50 °С в присутствии ионов Pb^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} определяли глюкоамилазную активность данных растворов, которую выражали в процентах к контролю (100 %, ферментный препарат без добавок): без стабилизатора – 130 %, в присутствии Pb^{2+} – 43, Fe^{3+} – 144, Zn^{2+} – 155 %.

Полученные данные свидетельствуют о том, что присутствие ионов цинка оказалось наиболее эффективным и привело к увеличению глюкоамилазной активности на 55 %, добавление ионов железа также оказывает положительное влияние на повышение глюкоамилазной активности исследуемого ферментного препарата (на 44 %), а ионы свинца

выступают в качестве ингибитора ультраконцентрата глюкоамилазы *Asp. awamori*.

Снимали спектры флуоресценции после их прогрева в присутствии ионов Pb^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} . Добавление ионов металлов изменяет спектр флуоресценции ферментного препарата (рис. 2). Так, после инкубирования с ионами свинца [9] спектр флуоресценции ультраконцентрата глюкоамилазы *Asp. awamori* имеет более четкий максимум. При этом интенсивность флуоресценции заметно уменьшается, т.е. снижению активности ультраконцентрата глюкоамилазы *Asp. awamori* соответствует уменьшение интенсивности флуоресценции.

Добавление ионов цинка и железа способствует увеличению

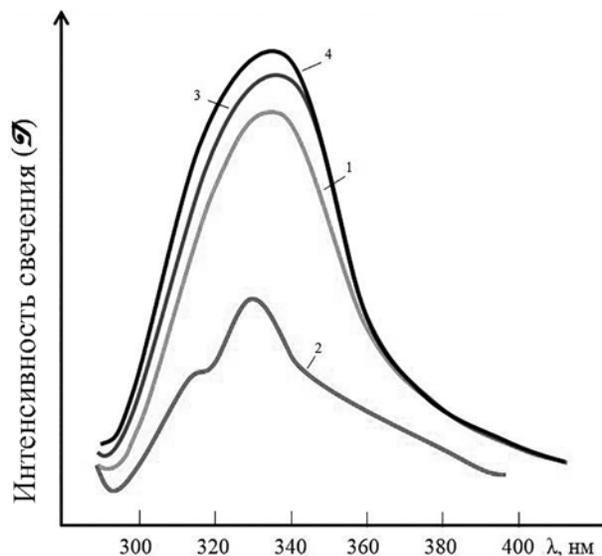


Рис. 2. Спектры собственной флуоресценции: 1 – ультраконцентрата глюкоамилазы *Asp. Awamori*, 2 – после добавления ионов Pb^{2+} , 3 – после добавления ионов Fe^{3+} , 4 – после добавления ионов Zn^{2+}

активности ферментного препарата и повышает интенсивность свечения, при этом происходит смещение λ_{\max} в спектре на 2–3 нм в сторону более коротких длин волн. Наибольший прирост активности наблюдался при добавлении ионов цинка, соответственно, и интенсивность свечения в этом случае максимальная (рис. 2).

Заключение

Совместное влияние ионов металлов и теплового воздействия на водный раствор ферментного препарата ультраконцентрата глюкоамилазы *Asp. awamori*, по всей видимости, вторичной и третичной структуры, так как триптофан [6, 8] и его остатки активно реагируют на изменение конформации. Повышение интенсивности свечения и смещение λ_{\max} в спектрах флуоресценции ультраконцентрата глюкоамилазы *Asp. awamori* в область более коротких длин волн указывает на увеличение гидрофобности окружения триптофана. Известно, что внутримолекулярные гидрофобные взаимодействия значительно влияют на общую систему кооперативных взаимосвязей в белках и полипептидах [15].

Таким образом, проведенные исследования дают косвенное подтверждение конформационных изменений в молекуле фермента под действием ионов некоторых металлов и при тепловом воздействии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бачурин А.П. Влияние некоторых физико-химических воздействий на активность глюкоаморина Г20Х // Ферментная и спиртовая пром-сть. 1995. № 2. С. 15–17.
2. Букина М.Н., Бакулев В.М., Лисаченко Д.А. Исследование люминесценции комплекса БТШ70-АТФ Mg^{2+} и его тепловой денатурации // Проблемы современной науки и образования. 2006. № 2 (44). С. 6–10.
3. Гамаюрова В.С., Зиновьева М.С., Васина К.Л. Активация и стабилизация ферментных препаратов неорганическими соединениями // Вестн. Казан. технол. ун-та. 2009. № 6. С. 121–130.
4. Гамаюрова В.С. Методы активизации амилолитических ферментов с целью снижения их удельного расхода // Современные ресурс- и энергосберегающие технологии в спиртовой и ликероводочной промышленности: тез. докл. науч.-практ. конф., Казань. Казань, 2000. С. 35.
5. Грачева И.М. и др. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1982. 240 с.
6. Емельяненко В.И., Грищенко В.М., Бурштейн Э.А. Компонентный анализ спектров триптофановой флуоресценции мелетина в процессе олигомеризации // Биофизика. 2005. Т. 50, № 4. С. 623–630.
7. Зуева Н.В., Агафонов Г.В., Корчагина М.В. и др. Выбор ферментных препаратов и температурно-временных режимов водно-тепловой и ферментативной обработки при разработке комплексной технологии переработки зернового сырья // Вестн. ВГУИТ. 2019. Т. 81, № 1. С. 112–119.
8. Кислухина О.В. Ферменты в пищевом производстве. М.: ДеЛи принт, 2002. 335 с.
9. Корбакова О.И., Сорокина Н.С., Молодкина Н.Н. и др. Свинец и его действие на организм (обзор литературы) // Медицина труда и пром. экология. 2001. № 5. С. 29–30.
10. Куликова Н.Е., Чернобровина А.Г. Изучение гидролиза крахмала зернового сорго с использованием комплекса ферментных препаратов // Хранение и переработка сельхозсырья. 2014. № 6. С. 23–25.
11. Куликова Н.Е., Чернобровина А.Г. Получение различных сахаристых продуктов из крахмалсодержащего сырья // Хранение и переработка сельхозсырья. 2014. № 5. С. 17–20.
12. Лысюк В.М., Шаненко Е.Ф., Гернет М.В., Эль-Регистан Г.И. Практические аспекты применения активации ферментных препаратов при получении пивного сусла // Пиво и напитки. 2010. № 2. С. 10–13.
13. Лысюк В.М. Совершенствование технологии пивного сусла на основе активации гидролитических ферментных препаратов микробного происхождения. М., 2011. 48 с.
14. Плохов А.Ю. Применение ферментных препаратов в спиртовой промышленности // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2002. № 3. С. 22–23.
15. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология / под ред. А.И. Арчакова, М.П. Кирпичникова, А.Е. Медведева, В.П. Скулачева; пер. с англ. О.В. Добрыниной, И.С. Севериной, Е.Д. Скоцеляс и др. М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2002. 446 с.
16. Halim Hamid S. (ed.) Handbook of Polymer Degradation (Second Edition). N.Y.: Dekker, 2000. 773 p.