

УДК 544.421+577.151

## Денатурация целлюлозолитических ферментов в присутствии воды

А. Л. БЫЧКОВ, В. А. БУХТОЯРОВ, О. И. ЛОМОВСКИЙ

*Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения РАН,  
ул. Кутателадзе, 18, Новосибирск 630128 (Россия)**E-mail: bychkov.a.l@gmail.com*

(Поступила 20.09.11)

### Аннотация

Изучена денатурация целлюлозолитических ферментов, продуцируемых микроорганизмом *Trichoderma viride*, в присутствии воды. Определены эффективные кинетические константы, характеризующие процесс денатурации. Показано, что ферменты в растворе обладают узкой зоной стабильности, устойчивы при температурах ниже 55 °С и быстро денатурируют при нагревании выше 65 °С. В сухом состоянии ферменты обладают большей устойчивостью и заметно денатурируют лишь при температурах выше 80 °С. Эффективная константа скорости денатурации экспоненциально зависит от содержания воды в ферментном препарате.

**Ключевые слова:** ферменты, термическая денатурация, стабильность, механоферментативные процессы

### ВВЕДЕНИЕ

Механоферментативные процессы позволяют успешно перерабатывать различные виды непищевого биовозобновляемого сырья, в первую очередь лигноцеллюлозные отходы сельского и лесного хозяйства, в биотопливо, проводить конверсию промышленно выращиваемых микроорганизмов в востребованные дорогостоящие продукты [1–7]. Последовательное сочетание предварительной механической активации сырья с последующим ферментативным гидролизом позволяет не только увеличивать скорость ферментативных процессов и выход целевых продуктов, но и решать ряд экологических и экономических проблем, характерных для традиционных ферментативных технологий.

Широкому внедрению механоферментативных процессов препятствует недостаточная изученность физико-химических процессов, протекающих на каждой из стадий обработки. С экономической точки зрения самую важную проблему в механоферментативной переработке возобновляемого сырья составляет постепенное снижение каталитической

активности дорогостоящих ферментных препаратов вследствие термической, механической денатурации или “дубления” ферментов фенольными компонентами биомассы, например лигнином. Чаще всего термическая денатурация наблюдается в результате несоблюдения технологических режимов, локальных перегревов, при использовании предварительной механической активации сухих смесей ферментов и субстратов, ультразвуковой обработке реагентов.

Для многих индивидуальных ферментов и комплексных препаратов определены оптимальные условия проведения реакций, изучены инактивация и реактивация, предложены механизмы стабилизации [7–13]. Однако подавляющее большинство работ рассматривают лишь денатурацию растворенных ферментов, практически не затрагивая процессы в твердой фазе. К тому же результаты, полученные в разных условиях и с использованием разных ферментных препаратов, трудно корректно сравнивать между собой. Недостаточно глубоко рассмотрена механическая денатурация ферментов в технологически применимых условиях.

Целью данной работы было экспериментальное изучение кинетики процессов денатурации целлюлозолитических ферментов, протекающей при нагревании в растворе и в сухой форме.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### *Реактивы и материалы*

В работе использовали комплексный целлюлозолитический ферментный препарат “ЦеллоЛюкс-А” (ООО ПО “Сиббиофарм”, г. Бердск Новосибирской обл.). Определение активности: бумага хроматографическая Whatman № 1, ацетатный буфер рН 4.7. Целлюлозолитический препарат представляет собой смесь ферментов, обладающих следующим профилем активности: ксиланаза – 8000 ед. акт./г, целлюлаза – 2000 ед. акт./г, β-глюканаза – до 1500 ед. акт./г, глюкоамилаза – 20 ед. акт./г. Содержание воды в образцах контролировалось при помощи автоматического анализатора влажности Radwag WPS 50SX (Польша). Содержание углеводов определялось на UV/VIS-спектрофотометре UNICO 2800 (США).

### *Денатурация ферментов в сухой форме*

Навеску (100 г) ферментативного препарата (влажность 2 %) выдерживали при температуре 60–115 °С. Через определенные промежутки времени отбирали пробы для определения целлюлозолитической активности.

### *Денатурация ферментов в растворе*

Водные растворы ферментного препарата (2 мг/мл) выдерживали при температуре 50–70 °С. Через определенные промежутки времени отбирали пробы для определения целлюлозолитической активности.

### *Денатурация при различной влажности ферментного препарата*

Навеска воздушно-сухого ферментного препарата помещалась в эксикатор над слоем дистиллированной воды. Через каждые 3 ч пре-

парат тщательно перемешивался. Благодаря высокой гигроскопичности образцов и равномерному перемешиванию, сорбция паров воды происходила быстро (за 3–20 ч в зависимости от требуемой влажности) и равномерно, что контролировалось при помощи прибора Radwag WPS 50SX (Польша). Полученные образцы денатурировались при 80 °С в условиях, используемых при исследовании денатурации в сухой форме.

### *Определение целлюлозолитической активности*

Для определения целлюлозолитической активности ферментов исходного препарата и ферментов препарата, подвергнутого термической обработке, проводили реакцию ферментативного гидролиза хроматографической бумаги и последующее определение суммы восстанавливающих углеводов (в пересчете на глюкозу).

К навескам 100 мг фильтровальной бумаги Whatman № 1 добавляли по 4.0 мл раствора ферментов с концентрацией 1.0 мг/мл. Реакционную смесь инкубировали при температуре 50 °С в течение 1 ч. Затем смесь выдерживали 15 мин при 95 °С для полной денатурации ферментов и охлаждали до комнатной температуры. Нерастворившийся остаток фильтровальной бумаги удаляли центрифугированием в течение 10 мин при 7000 мин<sup>-1</sup>, а надосадочную жидкость использовали для определения суммарного количества восстанавливающих углеводов.

### *Определение суммарного количества восстанавливающих углеводов*

Сумму восстанавливающих углеводов определяли восстановлением калия железосинеродистого  $K_3[Fe(CN)_6]$ . Для этого к 1.0 мл раствора углеводов с концентрацией от 30 до 150 мг/л добавляли по 3.0 мл 0.06 % раствора  $K_3[Fe(CN)_6]$ , перемешивали и выдерживали при 100 °С в течение 10 мин. После охлаждения растворы фотометрировали на UV/VIS-спектрофотометре UNICO 2800 при длине волны 420 нм против дистиллированной воды. Для построения калибровочных кривых использовали стандартные растворы глюкозы с концентрациями 30.0–150 мг/л.

За единицу активности препарата принимали количество миллиграммов глюкозы, полученной при гидролизе хроматографической бумаги ферментативным препаратом массой 1 г в течение 1 ч в условиях избытка целлюлозного субстрата. Отношение активности ферментов после нагревания к исходной активности использовалось для нахождения эффективных констант скорости денатурации.

Эксперименты по денатурации ферментов в растворе и в сухой форме повторялись трижды. Средние значения степеней протекания реакции использовались для построения кинетических кривых. Коэффициент корреляции между точками экспериментальных кривых и линией тренда, проведенной по экспоненциальному закону, соответствующему реакциям первого порядка, во всех случаях превышал 93 %.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

С целью изучения кинетики денатурации ферментов при нагревании в растворе и в сухой форме проведены эксперименты, в которых препарат “ЦеллоЛюкс-А” выдерживался при температурах 50–115 °С. Результаты представлены на рис. 1.

Видно, что ферменты в растворенном виде обладают чрезвычайно узкой зоной стабильности (см. рис. 1, а). При 50 °С (наиболее часто используемые в технологии условия) активность ферментов за технологически приемлемые времена уменьшается незначительно. Повышение температуры всего до 60–65 °С приводит к быстрой денатурации ферментов (3 и 1.5 ч соответственно), а при температурах выше 65 °С денатурация протекает практически мгновенно.

Ферментные препараты в сухой форме обладают большей стабильностью при нагревании (см. рис. 1, б). При температурах ниже 80 °С снижение активности незначительно, и лишь при температурах выше 100 °С денатурация протекает почти мгновенно.

Известно [12, 14, 15], что суммарный процесс денатурации ферментов описывается в рамках кинетических уравнений первого порядка:

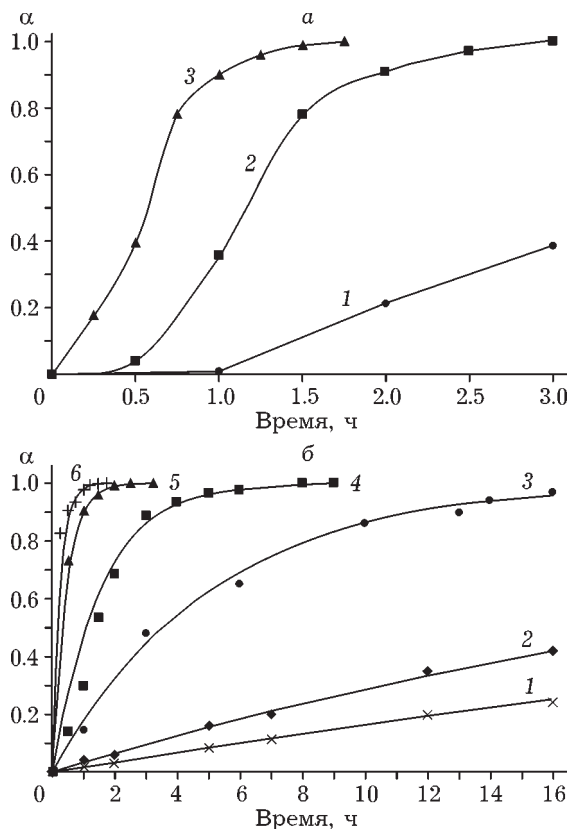
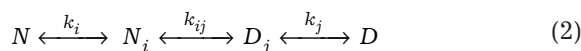


Рис. 1. Денатурация целлюлозолитических ферментов в растворе (а) и в сухой форме (б) при нагревании, °С: а – 55 (1), 60 (2), 65 (3); б – 60 (1), 65 (2), 80 (3), 90 (4), 100 (5), 110 (6). α – степень превращения процесса денатурации.



где *N* – исходная, активная форма ферментов; *N<sub>i</sub>* – сумма переходных состояний ферментов, способных катализировать реакции деполимеризации; *D<sub>j</sub>* – сумма переходных состояний, не способных катализировать реакции; *D* – конечная денатурированная форма ферментов.

В этом случае для нахождения эффективных термодинамических параметров процесса можно воспользоваться уравнениями  $-\ln \alpha = kt$

$$\frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln A = -\ln k \tag{4}$$

где α – степень превращения суммарного процесса (1); *k* – эффективная константа скорости реакции; *t* – время протекания реакции; *E<sub>a</sub>* – эффективная энергия активации; *T* – температура, при которой протекает процесс; *A* – предэкспоненциальный множитель; *R* – универсальная газовая постоянная.

ТАБЛИЦА 1

Кинетические параметры процесса денатурации ферментов в растворе и в сухом состоянии

Температура, °С	Эффективная константа скорости, с <sup>-1</sup>	
	В растворе	В сухой форме
≤50	Ферменты устойчивы длительное время	Ферменты устойчивы длительное время
55	$6.5 \cdot 10^{-5}$	То же
60	$4.0 \cdot 10^{-4}$	$5.0 \cdot 10^{-6}$
65	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$9.4 \cdot 10^{-6}$
70	Ферменты денатурируют практически мгновенно	$1.7 \cdot 10^{-5}$
80	То же	$5.5 \cdot 10^{-5}$
90	«	$1.8 \cdot 10^{-4}$
100	«	$6.3 \cdot 10^{-4}$
110	«	$1.1 \cdot 10^{-3}$
>110	«	Ферменты денатурируют практически мгновенно

В табл. 1 представлены вычисленные эффективные константы. Сравнение констант при одинаковых температурах показывает, что ферменты в сухой форме примерно на два порядка стабильнее при нагревании, чем в растворе, причем расчетные эффективные энергии активации составляют 118 кДж/моль для процесса в твердой фазе и 251 кДж/моль для процессов в растворе.

Большую энергию активации (при меньшей стабильности) для ферментов в растворе можно объяснить следующим образом. Во-первых, возможно, что молекулы воды сольватируют белки за счет образования развитой сетки водородных связей, в результате чего увеличивается потенциальный барьер, через который должна пройти система в ходе элементарного акта химического превращения. Однако в растворенном виде увеличивается и подвижность отдельных фрагментов белковой молекулы друг относительно друга, что приводит к уменьшению термической стабильности при увеличении энергии активации. Во-вторых, известно [12, 16], что суммарный процесс (1) денатурации ферментов можно разбить на ряд стадий (2), в которых между исходной и денатурированной формами белковые молекулы проходят через ряд промежуточных состояний  $N_i$  и  $D_j$ , способных с разной эффективностью катализировать реакции. О протекании такого каскада превращений можно судить по периоду индукции, наблюдаемому на начальном отрезке кинетических кривых (см. рис. 1, а). Отсутствие на кинети-

ческих кривых денатурации ферментов в сухой форме периода индукции может говорить о том, что при высушивании растворов ферментов белки приобретают конформацию  $N_i$ , в большей степени похожую на денатурированную, чем исходная  $N$ . Очевидно, что при нагревании белков в такой конформации для “завершения” каскада превращений необходима меньшая энергия.

Для определения влияния влажности ферментов на скорость денатурации получены образцы с различным содержанием воды. Прогрев данных образцов при 80 °С показал (рис. 2), что эффективная константа скорости экспоненциально растет при увеличении влажности. Наиболее устойчивыми оказались образцы с содержанием воды не более 8%. При повышении влажности выше 10% денатурация протекает быстро, а при влаж-

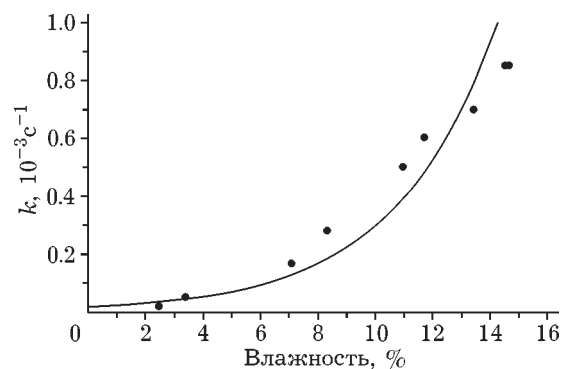


Рис. 2. Зависимость эффективной константы скорости денатурации от влажности ферментного препарата.

ности около 30 % константа скорости в твердой фазе сопоставима с таковой в растворе.

Таким образом, изучение процессов денатурации в растворе и в сухой форме показало, что влажность ферментов сильно влияет на скорость денатурации ферментов. Исходя из представленных данных, для осуществления механоферментативных процессов можно рекомендовать условия, предусматривающие работу с сухими смесями субстрат/фермент либо с растворами ферментов при температуре не выше 50–55 °С.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показано, что растворы целлюлолитического ферментного препарата “ЦеллоЛюкс-А” обладают низкой термической устойчивостью и быстро денатурируют при температурах выше 60 °С. При нагревании ферментов в сухой форме эффективная константа скорости денатурации значительно меньше константы скорости в присутствии воды; ферменты демонстрируют большую устойчивость и быстро денатурируют при температурах выше 100 °С. Эффективные константы скорости денатурации экспоненциально зависят от содержания воды в препаратах. Для процессов, протекающих при повышенной температуре, и процессов, связанных с кратковременными локальными повышениями температуры, например механической обработки, рационально использовать более устойчивую сухую форму ферментов.

Авторы выражают благодарность Т. Ф. Ломовской (ПО “Сиббиофарм”, г. Бердск) за оказанную помощь в подготовке статьи. Работа выполнена в рамках государственного контракта Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы” № 16.512.11.2165.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Синицын А. П., Гусаков А. В., Черноглазов В. М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. М.: Изд-во МГУ, 1995. 224 с.
- 2 Bychkov A. L., Korolev K. G., Lomovsky O. I. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010. Vol. 162. P. 2008–2014.
- 3 Lomovsky O. I., Lomovsky I. O. // *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry* / N. I. Lebovka, E. Vorobiev, F. Chemat (Eds.). London: Taylor&Francis (in press).
- 4 He X., Miao Y., Jiang X., Xu Z., Ouyang P. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010. Vol. 160, No. 8. P. 2449–2457.
- 5 Переволоцкая В. К., Афанасьева В. А., Головина Л. А. // *Рос. хим. журн.* 2002. Т. 46, № 2. С. 52–55.
- 6 Taherzadeh M. J., Karimi K. // *Int. J. Mol. Sci.* 2008. Vol. 9. P. 1621–1651.
- 7 Бычков А. Л., Рябчикова Е. И., Королев К. Г., Ломовский О. И. // *Химия уст. разв.* 2009. Т. 17, № 5. С. 479–486.
- 8 Vendruscolo M. // *Trends in Biotechnol.* 2002. Vol. 20, No. 1. P. 1–2.
- 9 Якушева Л. Д., Дубинская А. М. // *Биофизика.* 1984. Т. 29, № 2. С. 190–193.
- 10 Якушева Л. Д., Дубинская А. М. // *Биофизика.* 1984. Т. 29, № 3. С. 365–367.
- 11 Дубинская А. М. // *Биофизика.* 1980. Т. 25, № 4. С. 610–616.
- 12 Можжаев В. В., Мартинек К. // *Молекулярная биология.* Т. 16, Вып. 4. С. 676–694.
- 13 Ganesh K., Joshi J. B., Sawant S. B. // *Biochem. Eng. J.* 2000. Vol. 4. P. 137–141.
- 14 Ковалева Т. А., Кожокина О. М., Битюцкая Л. А., Меньшикова Т. Г. // *Вестн. ВГУ. Сер. химия, биология, фармация.* 2003. № 1. С. 57–60.
- 15 Чешкова А. В. Ферменты и технологии для текстиля, моющих средств, кожи, меха. Иваново: Изд-во ИГХТУ, 2007. 280 С.
- 16 Козлов Л. В. // *Биоорган. химия.* 1980. Т. 6, № 8. С. 1243–1254.