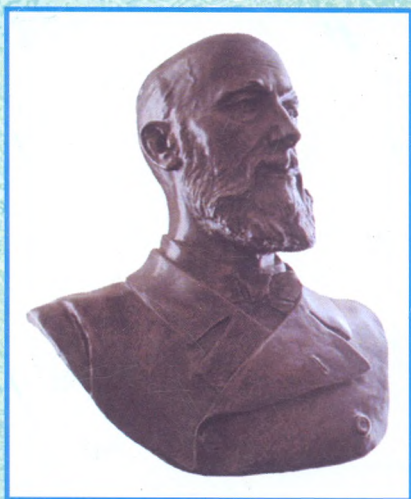


Бутлеровские сообщения



2023. Том 75. №7-9

ISSN 2074-0212

русскаяязычная печатная
версия с 2009 года

Международная версия нашего журнала с 2021 года
преобразована в три независимых Online журнала:

Butlerov Communications A
Advances in Organic Chemistry & Technologies

Butlerov Communications B
Advances in Chemistry & Thermophysics

Butlerov Communications C
Advances in Biochemistry & Technologies

International Edition in English from 2009 (Print):
Butlerov Communications



ISSN 2074-0948

Влияние природных полимеров на каталитическую активность ферментных препаратов

© Демьянцева^{1*} Елена Юрьевна, Смит² Регина Анатольевна,
Моргушко³ Денис Владимирович

¹ Кафедра физической и коллоидной химии; ² Межкафедральная лаборатория физико-химических методов исследования; ³ Кафедра охраны окружающей среды и рационального использования природных ресурсов. Высшая школа технологии и энергетики. Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна. ул. Ивана Черных, 4. г. Санкт-Петербург, 198095. Россия. Тел.: ¹⁾ +7 (921) 744-34-30; ²⁾ +7 (904) 638-37-57; ³⁾ +7 (999) 218-07-36. E-mail: ¹⁾ demyantseva@mail.ru ; ²⁾ zz1234567@yandex.ru ; ³⁾ tomas.morozov46@gmail.com

*Ведущий направление; +Поддерживающий переписку

Ключевые слова: липаза, ксиланаза, целлюлаза, альгинат натрия, желатин, иммобилизация, каталитическая активность.

Аннотация

Актуальным направлением развития промышленности является внедрение экологически дружелюбных наилучших доступных технологий. Ферменты класса гидролаз применяются в большом числе отраслей человеческой деятельности. Неоспоримым преимуществам их применения претит высокая стоимость, лабильность пространственной структуры, нестойкость к агрессивным производственным условиям, сложность регенерации из реакционной системы. Иммобилизация позволит нивелировать данные недостатки. В работе рассмотрена возможность иммобилизации коммерческих полиферментных препаратов (липазного, ксиланазного, целлюлазного) на природных полимерах – альгинате натрия и желатине. Установлено, что лучшим носителем для иммобилизации липазы является альгинатная матрица. Возрастание ферментативной активности при иммобилизации может быть связано с закреплением каталитически выгодной конформации фермента в матрице носителя. Помимо прочего альгинат способен сорбировать жирные кислоты, выводя тем самым продукт реакции и смещая равновесие гидролиза субстрата в сторону образования продуктов реакции. Нестехиометричность состава фермент-полиэлектролитного комплекса способствует его растворимости, так как большая часть ионогенных групп полиэлектролита не вовлечена во взаимодействие с противоположно заряженными группами протеина и упрочнение связей в фермент-полиэлектролитном комплексе происходит вследствие увеличения числа контактов при его образовании, что приводит к повышению резистентности фермента к денатурирующим воздействиям. При этом остаточная активность при хранении в течение 6 месяцев осталась на уровне 70% от исходной активности иммобилизованной липазы. Иммобилизация целлюлазного и ксиланазного препаратов ухудшает его каталитическую активность на 60%, вероятно, из-за появления стерических препятствий к доступу активного центра фермента к субстрату.

Выходные данные для цитирования русскоязычной печатной версии статьи:

Демьянцева Е.Ю., Смит Р.А., Моргушко Д.В. Влияние природных полимеров на каталитическую активность ферментных препаратов. *Бутлеровские сообщения*. 2023. Т.75. №7. С.99-106.

DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/23-75-7-99

Выходные данные для цитирования русскоязычной электронной версии статьи:

Демьянцева Е.Ю., Смит Р.А., Моргушко Д.В. Влияние природных полимеров на каталитическую активность ферментных препаратов. *Бутлеровские сообщения* С. 2023. Т.6. №3. Id.2. DOI: 10.37952/ROI-jbc-RC/23-6-3-2

Введение

Биокатализ является актуальным направлением развития современной химической технологии с многоточечным использованием его во многих отраслях: биотехнологии, фармацевтической и пищевой промышленности, медицине, биохимическом анализе и т.д. Ферменты – био-

логические катализаторы, способные ускорять биохимические реакции в живых организмах. Гидролазы нашли применение при переработке различных волокнистых полуфабрикатов [1-6]. Ферменты в качестве катализаторов могут требоваться в очень маленьких концентрациях, что позволяет ускорять реакции при минимальном расходе энзимов, обеспечивая, при этом, их преимущества: высокую энантиоспецифичность, быструю кинетику, требуемые менее жёсткие условия катализа, отсутствие токсичных продуктов реакции, малый расход, низкую нагрузку на водоочистные сооружения. Однако их высокая стоимость, лабильность пространственной структуры, нестойкость к агрессивным производственным условиям (высокие температуры, скачки pH, присутствие детергентов и т.п.), сложность регенерации из реакционной системы делают их использование затруднительным [7, 8]. Помимо прочего необходимо учитывать неспецифическую сорбцию ферментов в процессе гидролиза [9].

Нивелировать действие негативных факторов позволит иммобилизация ферментных препаратов на полимерные носители, которые помогают сохранять и/или повышать их каталитическую активность [10, 11]. Использование функциональных иммобилизованных каталитических систем может увеличить кратность использования ферментов в реакционных циклах биокатализа.

Большинство коммерческих ферментных препаратов представляют собой смеси энзимов различного каталитического действия, что делает возможность максимальной биоконверсии лигноцеллюлозного сырья. Активность ферментных препаратов во многом зависит от содержания в субстрате различных фракций (целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина), а эффективность биокатализа – от состава ферментного препарата. Для определения наиболее эффективных ферментных препаратов для гидролиза конкретных видов сырья, необходимо комплексное исследование закономерностей гидролитических процессов [12]. Актуальными являются идеи биоапалпинга растительного сырья, в частности обработка штаммами микромицетов, проявляющих наибольшую оксидазную и целлюлозолитическую активность на агаризованных средах с галловой кислотой и карбоксиметилцеллюлозой [13].

Целью данной работы является изучение влияния иммобилизации на природных полимерах различных комплексов ферментов класса гидролаз на их каталитическую активность.

Экспериментальная часть

Для исследования были выбраны следующие ферментные препараты: липазный – Resinase A 2X, ксиланазный – Xyllo Pre, целлюлазный – FiberCare U (Novozymes). В качестве полимерной матрицы носителей использовали желатин пищевой («Химснаб-СПб») и альгинат натрия для биохимии (AppliChem).

Для исследования влияния природных полимеров на каталитическую активность ферментных препаратов была проведена иммобилизация выбранных препаратов методом включения их в гелевую структуру альгината натрия и желатина. Сухую навеску порошкообразного альгината натрия и желатина помещали в 35 мл дистиллированной воды и оставляли для набухания на магнитной мешалке в течение 5-15 мин. Затем растворы выдерживали при температуре 60 °C при перемешивании до полного растворения, после чего остужали до комнатной температуры и при интенсивном перемешивании приливали ферментные препараты. Готовили системы, содержащие разные соотношения ферментный препарат-полимер.

Растворы энзимов с альгинатом натрия набирали в шприц и выдавливали в 1М раствор CaCl_2 комнатной температуры для образования сферических гранул (рис. 1).

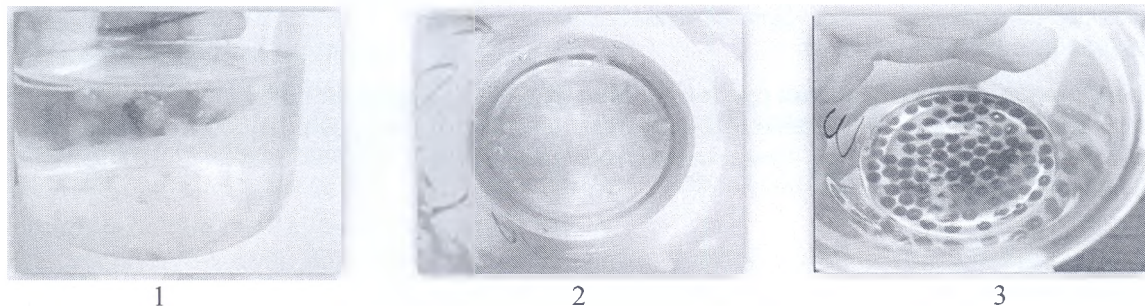


Рис. 1. Ферментные препараты, иммобилизованные в альгинате натрия:
1 – Resinase A 2X, 2 – Xyllo Pre, 3 – FiberCare U

Раствор с иммобилизованными ферментами в желатине для застывания плёнок помещали в чашки Петри и оставляли на сутки (рис. 2).

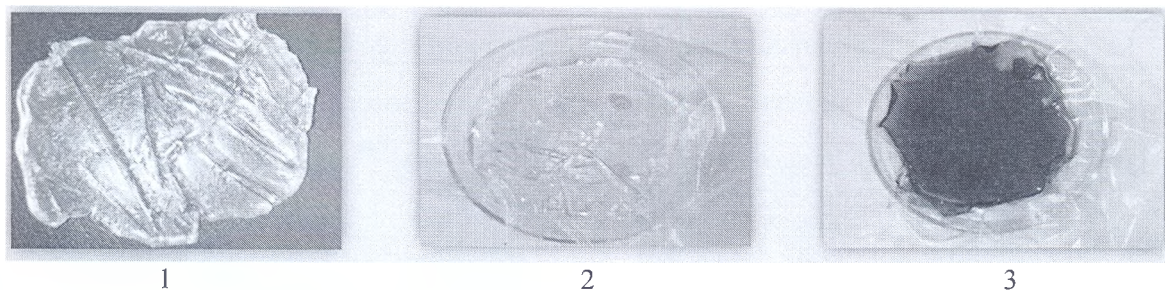


Рис. 2. Ферментные препараты, иммобилизованные в желатине:
1 – Resinase A 2X, 2 – Xyllo Pre, 3 – FiberCare U

Определение каталитической активности ферментных препаратов проводили титриметрическим и фотоколориметрическим методами. Липазную активность определяли по методу Ота-Ямада [8], ксиланазную – при помощи окрашенного субстрата [14], целлюлазную – при количественном определении восстанавливающих сахаров, образующихся в результате гидролиза целлюлозы хроматографической бумаги [15]. Эффективность иммобилизации контролировали по остаточному содержанию белка в растворе методом Лоури [16].

Хранение иммобилизованных препаратов в буферном растворе осуществляли в холодильной камере при 4.5 °С. Периодическое определение остаточной активности иммобилизованных препаратов первые 2 месяца проводили 2 раза в неделю, затем 1 раз в 4 недели.

Результаты и их обсуждение

Ухудшение каталитической активности энзимов при действии негативных факторов можно компенсировать при их иммобилизации. Известно, что белковые молекулы ферментов являются полиамфолитами. С полипептидной цепью могут взаимодействовать соединения, содержащие ионогенные группы. В результате образуются нековалентные белок-полиэлектrolитные комплексы [17].

Главными условиями проявления активационного и стабилизационного эффектов при иммобилизации являются наличие электростатических контактов между компонентами системы и водорастворимость фермент-полиэлектrolитных комплексов (ФПК). Такой растворимостью обладают комплексы нестехиометрического состава, в которых большая часть заряженных групп полиэлектролита не вовлечена во взаимодействие с противоположно заряженными группами белка. Увеличение числа контактов при образовании фермент-полиэлектrolитного комплекса приводит к его упрочнению, и тем самым, обеспечивает повышение устойчивости фермента к инактивации различными факторами. Стабильность белок-полиэлектrolитных комплексов может быть обусловлена гидрофобными взаимодействиями или водородными связями, возникающими вследствие не ионных взаимодействий между молекулами белка и неполярными участками полиэлектролита [18]. Помимо прочего присутствие полиэлектролита приводит к изменению кинетической подвижности связанных молекул белка, фермент стабилизируется, возрастает роль диффузионного фактора, вследствие чего формируется наиболее термодинамически выгодная структура энзима, образующая ФПК [19].

Для выявления оптимального соотношения ферментный препарат-полимер была определена целевая ферментативная активность в зависимости от соотношения компонентов системы. Результаты представлены на рис. 3-5.

При преимущественном содержании полиэлектролитов в системе ферментная активность снижается. Это может быть связано с внутримолекулярными взаимодействиями в самих полимерах вследствие их частичной дегидратации, в результате которых ухудшается доступность активного центра липазы для субстрата.

Возрастание ферментативной активности с увеличением количества полиэлектролита при его содержаниях до 70% в комплексе может быть связано с закреплением каталитически выгодной конформации фермента в матрице носителя [20].

Активность липазы в среде водорастворимых полимеров выше, чем у нативного ферментного препарата и максимальна при соотношении липаза : альгинат натрия 30:70. Такое

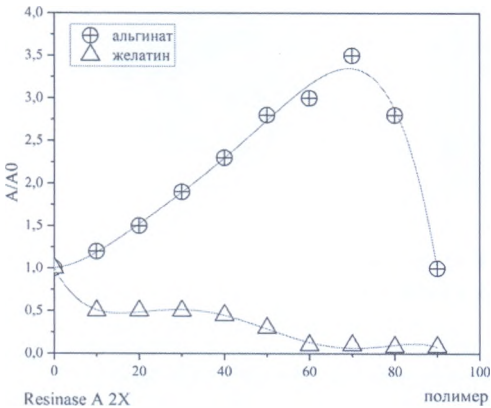


Рис. 3. Зависимость относительной активности липазного препарата Resinase A 2X от состава ФПК

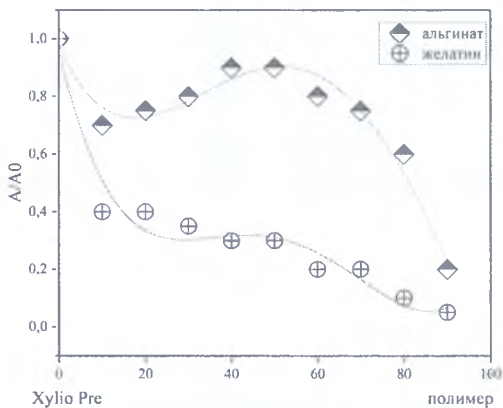


Рис. 4. Зависимость относительной активности ксиланазного препарата Xyllo Pre от состава ФПК

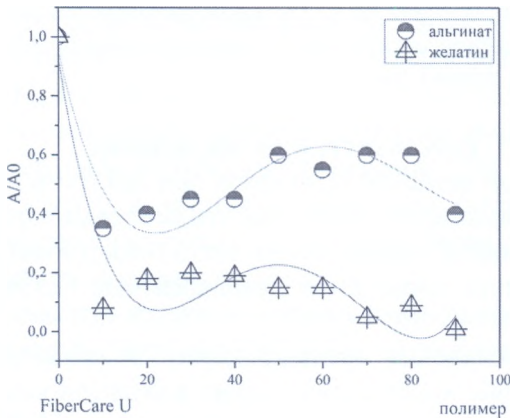


Рис. 5. Зависимость относительной активности целлюлазного препарата FiberCare U от состава ФПК

Структура полимера описывается как одна длинная цепочка глобулярных сегментов, что придает молекуле значительную подвижность. Было показано [22, 23], что альгинат натрия обладает сорбционной активностью по отношению к жирным кислотам. Сродство его поверхности к продуктам ферментативного гидролиза, то есть их удаление из реакционной смеси, сдвигает равновесие реакции гидролиза субстрата в сторону образования продуктов реакции [17, 24]. В составах с минорными содержаниями полимера наблюдается меньшая активность, вероятно, из-за недостаточности образования микрогетерогенной границы раздела фаз.

Важным условием проявления активационного и стабилизирующего эффектов является растворимость ФПК в воде. Такой растворимостью обладают комплексы нестехиометрического состава, в которых большая часть ионогенных групп полиэлектролита не вовлечена во взаимодействие с противоположно заряженными группами протеина. Упрочнение связей в ФПК происходит вследствие увеличения числа контактов при его образовании, что приводит к повышению резистентности фермента к денатурирующим воздействиям [20].

Табл. 1. Оптимальный состав фермент-полиэлектrolитных комплексов

	Ферментный препарат, %	Полиэлектrolит, %
Resinase A 2X	30	70
Xyllo Pre	50	50
FiberCare U	40	60

Для дальнейших исследований использовали ФПК состава, представленного в табл. 1.

Определение количества белка в промывных водах показало, что степень включения фермента в матрицу полимера составила 87%.

Коммерческие ферментные препараты могут

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ ПОЛИМЕРОВ НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТНЫХ... 99-106
содержать в себе не только заявленный целевой энзим, но и сопутствующие ферменты того же класса. Поэтому была проведена оценка влияния иммобилизации на липазную, ксиланазную и целлюлазную активность всех объектов исследования. По результатам исследования был проведен расчет каталитической активности ферментных препаратов (табл. 2).

Табл. 2. Показатели активности ферментных препаратов в нативном и иммобилизованном виде

Препарат	Вид активности	Активность, ед/г		
		До иммобилизации	После иммобилизации	
			желатин	альгинат
Resinase A 2X	Липазная	48.8	26.2	64.3
	Ксиланазная	0.2	0.1	0.0
	Целлюлазная	0.0	0.0	0.0
Xylio Pre	Липазная	4.8	0.4	6.0
	Ксиланазная	26.7	10.0	23.6
	Целлюлазная	0.0	0.0	0.0
FiberCare U	Липазная	5.4	0.6	7.3
	Ксиланазная	0.5	0.2	0.3
	Целлюлазная	17.8	2.6	10.1

Установлено, что липазный и ксиланазный препараты не обладают целлюлазной активностью. Иммобилизация целлюлазного препарата ухудшает его каталитическую активность на 60%, вероятно, из-за появления стерических препятствий к доступу активного центра фермента к субстрату [25].

Установлено, что липазная активность всех ферментных препаратов улучшается, соответственно, при иммобилизации с использованием кальций-альгинатного носителя на 25-32%, вероятно из-за закрепления каталитически активной (выгодной) конформации фермента в результате его многоточечных электростатических взаимодействий с полиэлектролитом [26] и снижается при иммобилизации с использованием желатинового носителя.

Установлено, что ксиланазная активность ферментных препаратов снижается на 23-60% при иммобилизации с использованием кальций-альгинатного и желатинового носителя. Поскольку происходит внешнее гелеобразование микрочастиц при иммобилизации ферментов, то затрудняется диффузия белков к субстрату из-за наличия «барьера» (носителя). Поскольку ксилан, в отличие от триглицеридов, является сложным субстратом, у которого целевые гидролизруемые связи менее доступны, и вследствие экранирования активного центра «барьером», ксиланазная активность всех ферментных препаратов снижается [26]. Снижение каталитической активности на альгинате возможно также из-за конкурирующих реакций гидролиза самого носителя (связи $\beta \rightarrow 1.4$).

Для оценки эксплуатационных характеристик была оценена зависимость каталитической активности липазного препарата Resinase A 2X, иммобилизованного в альгинате, от времени хранения. Кинетическая зависимость остаточной активности иммобилизованных препаратов приведена на рис. 6.

При условиях хранения полученных биока-тализаторов в холодильной камере наблюдалось незначительное снижение каталитической активности иммобилизованных ферментов по истечении 4-6 месяцев (до 70% активности), что свидетельствует об эффективности предложенного способа иммобилизации.

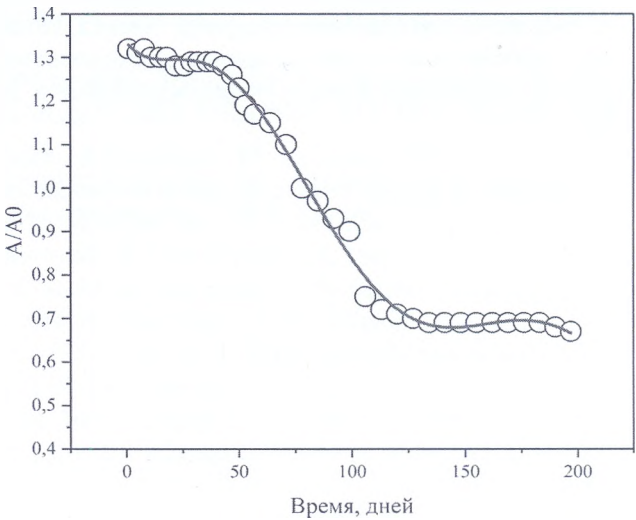


Рис. 6. Зависимость остаточной активности липазного препарата, иммобилизованного в альгинате, от времени выдерживания

Заключение

Результаты работы демонстрируют возможность использования альгината натрия для иммобилизации липазного коммерческого ферментного препарата. Перспективность использования данного природного полимера как носителя подтверждается повышением ферментативной активности липазы и хорошей стабильностью при хранении.

Англоязычная версия данной статьи опубликована в электронном журнале *Butlerov Communications C* [27]. Русскоязычная версия данной статьи опубликована также в электронном журнале *Бутлеровские сообщения C* [28].

Выводы

1. Показано, что коммерческие нативные гидролитические ферментные препараты на основе ксиланазы и целлюлазы обладают каталитической активностью относительно неспецифического субстрата – триглицеридов, то есть липазной активностью.
2. Оптимальным носителем для иммобилизации ферментов класса гидролаз (липазы, целлюлазы, ксиланазы) является альгинатно-кальциевая матрица.
3. При использовании желатиновой матрицы наблюдается снижение каталитической активности всех энзимов, вероятно, из-за возникающих белок-белковых взаимодействий, приводящих к изменению их конформации.

Литература

- [1] Новожилов Е.В. Применение ферментных технологий в целлюлозно-бумажной промышленности: монография. *Архангельск: ИПЦ САФУ. 2013.* 383с.
- [2] Смит Р.А., Демьянцева Е.Ю., Андранович О.С. Анализ состояния смолы при обессмоливании сульфатной листовенной целлюлозы. *ИВУЗ «Лесной журнал».* **2019.** №4. С.168-178. DOI: 10.17238/issn0536-1036.2019.4.168
- [3] Болотова К.С., Новожилов Е.В. Применение ферментных технологий для повышения экологической безопасности целлюлозно-бумажного производства. *Химия растительного сырья.* **2015.** №3. С.5-23.
- [4] Громов Н.В., Таран О.П., Сорокина К.Н., Мищенко Т.И., Шивакумар Утанди, Пармон В.Н. Новые методы одностадийной переработки полисахаридных компонентов лигноцеллюлозной биомассы (целлюлозы и гемицеллюлоз) в ценные продукты. Часть 1. Методы активации биомассы. *Катализ в промышленности.* **2016.** Т.16. №1. С.74-83. DOI 10.18412/1816-0387-2016-1-74-83
- [5] Сорокина К.Н., Самойлова Ю.В., Пилигасв А.В., Шивакумар Утанди, Пармон В.Н. Новые методы одностадийной переработки полисахаридных компонентов лигноцеллюлозной биомассы (целлюлозы и гемицеллюлоз) в ценные продукты. Часть 2. Подходы, применяемые в биотехнологической переработке поли- и моносахаридов в ценные продукты, востребованные химической промышленностью. *Катализ в промышленности.* **2017.** Т.17. №1. С.70-77. DOI: 10.18412/1816-0387-2017-1-70-77
- [6] Копнина Р.А., Демьянцева Е.Ю., Карпов И.А., Андранович О.С. Влияние смесей амфифильных соединений и ферментных препаратов на смолистость волокнистых полуфабрикатов. *Бутлеровские сообщения.* **2015.** Т.42. №4. С.158-161. ROI: jbc-01/15-42-4-158
- [7] Влах Е.Г., Платонова Г.А., Тенникова Т.Б. Получение и изучение свойств проточных биореакторов на основе макропористых монолитов. *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия.* **2016.** Т.57. №2. С.89-95.
- [8] Зиновьева М.Е., Шнайдер К.Л., Зарипова С.К. Изучение процесса иммобилизации микробной липазы. *Бутлеровские сообщения.* **2023.** Т.73. №1. С.123-128. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/23-73-1-123
- [9] Емельянова М.В., Чухчин Д.Г., Новожилов Е.В. Перспективы использования липазы в целлюлозно-бумажном производстве. *Лесной журнал.* **2007.** №1. С.110-118.
- [10] I. Chibata. Biocatalysis: Immobilized cells and enzymes. *Journal of Molecular Catalysis.* **1986.** Vol.37. P.1-24.
- [11] Есимбекова Е.Н., Говорун А.Е., Лоншакова-Мукина В.И., Кратасюк В.А. Желатин и крахмал: что лучше стабилизирует активность ферментов? *Доклады Российской Академии Наук. Науки о жизни.* **2020.** Т.491. С.151-154. DOI: 10.31857/S2686738920020110
- [12] Харина М.В., Валеева Р.Т., Мухачев С.Г., Емельянов В.М. Исследование кинетики и оптимизация условий проведения процесса гидролиза соломы ферментным комплексом NS50012. *Вестн. Каз. Техн. Ун-та.* **2012.** Т.13. С.210-212.

- [13] Шарапова И.Э. Отбор штаммов базидиальных и микромицелиальных грибов для биоопалпинга древесных субстратов. *Бутлеровские сообщения*. **2018**. Т.56. №11. С.140-145. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/18-56-11-140
- [14] ГОСТ 31488- 2012. Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности ксиланазы. Москва: *Стандартинформ*. **2012**. 12с.
- [15] ГОСТ 31662- 2012. Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности целлюлазы. Москва: *Стандартинформ*. **2012**. 13с.
- [16] O.H. Lowry. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* **1951**. Vol.193. P.265-275.
- [17] Тульская Е.В., Зайцев С.Ю., Каштиго Т.В. Влияние параметров среды на активность липазы из поджелудочной железы свиньи, иммобилизованной в полиэлектrolитные комплексы. *Ветеринарная медицина*. **2006**. №2-3. С.59-60.
- [18] Кабанов В.А. Полиэлектrolитные комплексы в растворе и в конденсированной фазе. *Успехи химии*. **2005**. Т.74. №1. С.5-23.
- [19] Смагина В.В., Фенин А.А., Авраменко Г.В. Исследование процесса инактивации иммобилизованного ферментного комплекса в различных средах. *Бутлеровские сообщения*. **2012**. Т.32. №11. С.38-43. ROI: jbc-01/12-32-11-38
- [20] Разработка методик и создание биохимических коллоидных систем для ветеринарно-биологических и зоотехнических направлений: отчет о НИР (промежуточ. №3). рук. Балакирев Н.А.; исполн.: Зайцев С.Ю. [и др.]. Москва: *Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина*. **2010**. 120с.
- [21] Разработка методик и создание биохимических коллоидных систем для ветеринарно-биологических и зоотехнических направлений: отчет о НИР (промежуточ. №1): Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К. И. Скрябина; рук. Балакирев Н.А.; исполнитель: Зайцев С.Ю. [и др.]. Москва. **2009**. 150с.
- [22] Мухаммед А.А., Максимов М.Л. Сравнительное изучение параметров сорбции пищевых волокон на примере пектина, хитозана и альгината относительно жирных кислот и триглицеридов. *Материалы Международной научно-практической конференции «Современная медицина: актуальные вопросы и перспективы развития»*. Уфа. **2014**. С.84-85.
- [23] Мухаммед А.А., Максимов М.Л. Сорбирующие свойства пектина, альгината и хитозана по отношению к жирным кислотам и триглицеридам. *Материалы I Международной научно-практической конференции «Научный поиск»*. Москва. **2014**. С.5-7.
- [24] Тульская Е. В. Влияние альбумина на каталитическую активность липаз, выделенных из различных источников. *Ветеринарная медицина*. **2008**. №4. С.8-9.
- [25] Пестовский Ю.С. Иммобилизация пероксидазы хрена в гидрогеле и микрочастицах альгината кальция. *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета*. **2013**. Т.8. №92. С.1-18.
- [26] M. Ratto., A. Kantelinen, M. Bailey, L. Viikari. Potential of enzymes for wood debarking. *Tappi J.* **1993**. Vol.76. No.2. P.125-128.
- [27] Elena Yu. Demyantseva, Regina A. Smit, Denis V. Morgushko. The influence of biopolymers on the catalytic activity of enzyme preparations. *Butlerov Communications C.* **2023**. Vol.6. No.3. Id.2. DOI: 10.37952/ROI-jbc-C/23-6-3-2
- [28] Демьянцева Е.Ю., Смит Р.А., Моргушко Д.В. Влияние природных полимеров на каталитическую активность ферментных препаратов. *Бутлеровские сообщения С.* **2023**. Т.6. №3. Id.2. DOI: 10.37952/ROI-jbc-RC/23-6-3-2