

АДСОРБЦИОННАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ β -ФРУКТОФУРАНОЗИДАЗЫ НА ВОЛОКНИСТОМ ИОНООБМЕННИКЕ ФИБАН А-6

© 2011 Е. В. Калач¹, М. Е. Балакина²

¹Воронежская государственная технологическая академия, пр. Революции 19, 394006 Воронеж, Россия

²Воронежский государственный университет, Университетская пл. 1, 394006 Воронеж, Россия

Поступила в редакцию 22.03.2011 г.

Аннотация. Получен иммобилизованный препарат β -фруктофуранозидазы на волокнистом ионообменнике ФИБАН А-6. Подобраны оптимумы концентрации ионообменника ФИБАН А-6 и фермента, исследованы термостабильность, рН-оптимум, температурный оптимум иммобилизованной β -фруктофуранозидазы, реакция гидролиза сахарозы. Показано, что адсорбция β -фруктофуранозидазы на волокнистом ионообменнике ФИБАН А-6 приводит к получению наиболее стабильного иммобилизованного ферментного препарата по сравнению с чистым ферментом.

Ключевые слова: иммобилизация, волокнистый ионообменник, углеводы.

ВВЕДЕНИЕ

В России в течение последних лет одной из динамичных и развивающихся отраслей является кондитерская, в частности, производство шоколада и шоколадных изделий. Однако шоколадные конфеты представляют собой высококалорийные продукты с высоким содержанием сахара и жира и, тем самым, составляют потенциальную опасность для здоровья населения страны [1].

Кроме того, с каждым годом на земле увеличивается количество людей страдающих ожирением или избыточным весом, и сегодня в результате многочисленных эпидемиологических исследований абсолютно точно доказана связь между питанием и развитием различных заболеваний [2].

Совершенствование качества кондитерских изделий путем улучшения их потребительских свойств за счет снижения содержания сахарозы является актуальной задачей, имеющей практическое значение. Снижение энергетической ценности кондитерских изделий возможно путем замены сахарозы функциональными ингредиентами, например, фруктозой или глюкозо-фруктозным сиропом [3].

Фруктозные сиропы занимают далеко не последнее место в ряду заменителей сахара. Это обусловлено и тем, что фруктоза в полной мере удовлетворяет медико-биологическим требованиям диетического питания, и тем, что фруктозные сиропы на 40 % дешевле сахара [4].

Целью исследования являлось получение иммобилизованного препарата β -фруктофуранозидазы на волокнистом ионообменнике ФИБАН А-6.

Адсорбционная иммобилизация β -фруктофуранозидазы, расщепляющего сахарозу на глюкозу и фруктозу, на неорганических носителях позволяет сохранить стабильность фермента за счет ограничения его способности денатурировать при изменениях рН, температуры и растворителей, что приводит к удешевлению процесса получения фруктозы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовали очищенный ферментный препарат β -фруктофуранозидазу, выделенный из дрожжей *Kluyveromyces marxianus Y-303*. Культивирование дрожжей *Kl. marxianus* осуществляли глубинным способом. Для выделения ферментного препарата использовали осаждение различными органическими растворителями, фракционирование сульфатом аммония, ионообменную хроматографию DEAE-целлюлозе, гель хроматографию на сефадексе G-25 и G-150. Гомогенность полученных фракций определяли модифицированным методом электрофореза в полиакриламидном геле [5, 6]. Содержание белка в препарате свободного фермента определяли методом Лоури [7], в иммобилизованной β -фруктофуранозидазе — модифицированным ме-

тодом Лоури [8]. Определение активности свободной β -фруктофуранозидазы осуществляли методом Бертрана [9] 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.

В качестве носителя для иммобилизации фермента β -фруктофуранозидазы *Kluveromyces marxianus* Y-303 использовали волокнистый ионообменник ФИБАН А-6. Подготовку ионита к иммобилизации осуществляли путем кондиционирования ионообменника и перевода его в нужную ионообменную форму [11]. Фермент иммобилизовали адсорбционным методом.

Термоинактивацию растворимой β -фруктофуранозидазы изучали в диапазоне температур 30—80 °С. Влияние рН на активность β -фруктофуранозидазы изучали в интервале 3,0—7,0. Аналогично поступали в случае иммобилизованного фермента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для проведения сорбционной иммобилизации β -фруктофуранозидазы 1 г носителя оставляли на ночь при комнатной температуре в 50 мл ацетатного буфера (рН 4,0), затем сливали избыточную жидкость и добавляли растворы ферментов различных концентраций (от 0,1 до 1 мг/мл, рН 4,0), 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-1000 через разные промежутки времени.

Для определения каталитической активности свободной и иммобилизованной β -фруктофуранозидазы проводили реакцию гидролиза сахарозы (60 %-раствор) в двух ферментерах, помещенных на магнитную мешалку и соединенных с термостатом. В одном ферментере проводили инкубацию β -фруктофуранозидазы с субстратом в течение 20 мин при температуре 50 °С и рН 4,0, в другой — вместо фермента помещали такое же количество ацетатного буфера, рН 4,0 при определении каталитической активности иммобилизованной β -фруктофуранозидазы температура гидролиза субстрата составила 70 °С.

Для гидролиза субстрата в непрерывном режиме использовали стеклянный реактор, представляющий собой термостатируемую колонку высотой 40 см и диаметром 1,5 см. При подготовке к работе реактор промывали ацетатным буфером (рН 4,0).

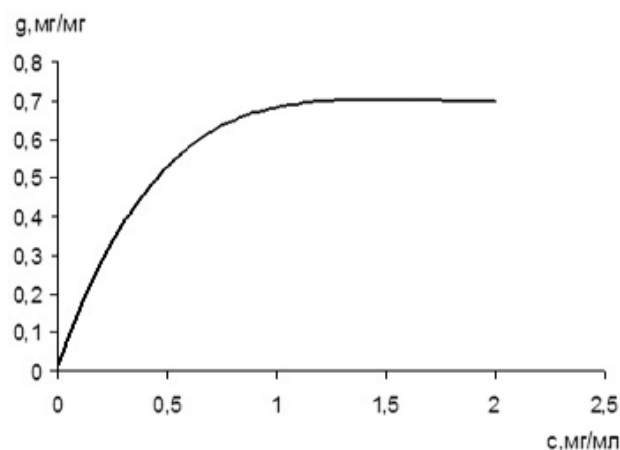


Рис. 1. Кривая сорбции β -фруктофуранозидазы на волокнистом носителе ФИБАН А-6: g — масса белка, связавшегося с носителем, c — концентрация водного раствора фермента

В среднем 1 г сорбента содержал 0,7 мг иммобилизованной инвертазы, выход иммобилизованной инвертазы лежал в диапазоне 68—71 % (рис. 1). Одновременно с опытами по определению сорбционной способности ионообменника по отношению к β -фруктофуранозидазе контролировали активность свободного и иммобилизованного фермента.

С ростом содержания белка в препарате удельная (на единицу количества белка) активность монотонно падает. Такое понижение активности, наблюдаемое для многих ферментов, объясняется кооперативным эффектом сорбции, т.е. взаимным воздействием рядом расположенных на сорбенте молекул белка, что приводит к экранированию активного центра фермента. Были установлены наиболее оптимальные для практических целей условия функционирования (рН, температура) полученных препаратов. У свободного фермента максимальная активность проявляется при рН 4,0 и температуре 50 °С.

Для определения рН-оптимума иммобилизованной β -фруктофуранозидазы гидролиз сахарозы осуществляли в интервале рН 3,0—7,0. Заданное значение рН субстрата поддерживали с помощью 0,1 М ацетатного буфера. Гидролиз проводили при температуре 50 °С в течение 10 мин.

Как видно из рис. 2, иммобилизованная β -фруктофуранозидаза проявляет максимальную активность при рН 4,0—4,1.

Влияние температуры на активность ферментов объясняется тем, что она, с одной стороны, воздействует на белковую часть фермента, приводя

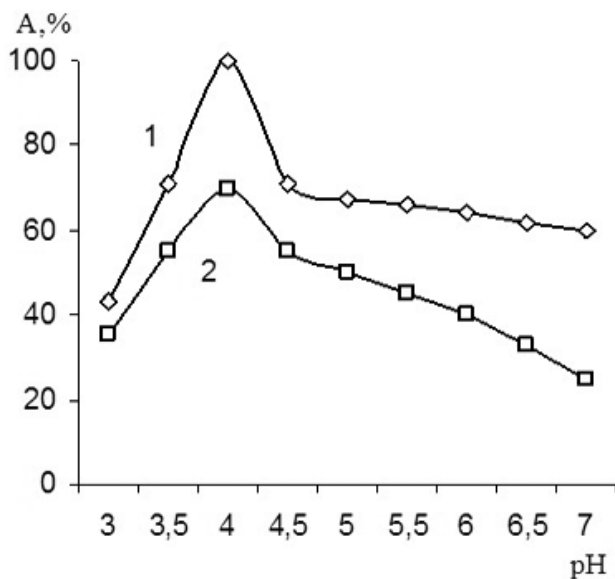


Рис. 2. Зависимость 1-свободной и 2 — иммобилизованной β -фруктофуранозидазы (% от максимальной) при температуре 50 °С от величины рН

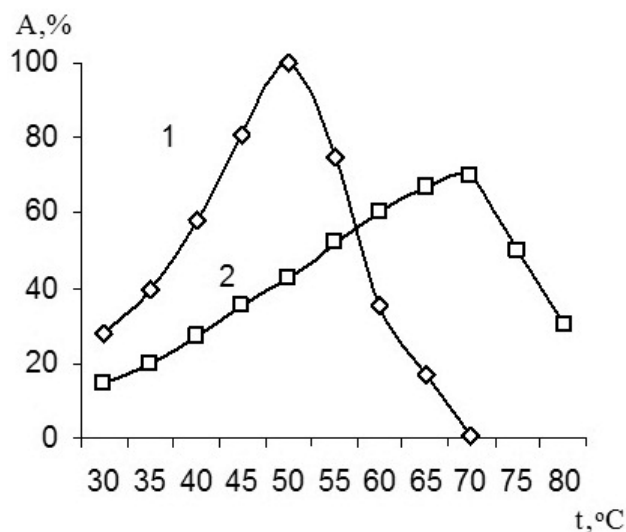


Рис. 3. Влияние температуры на активность свободной (1) и иммобилизованной (2) β -фруктофуранозидазы (% от максимальной) при оптимальной величине рН

его к денатурации и снижению каталитической функции, а с другой стороны — интенсифицирует скорость реакции образования фермент-субстратного комплекса и все последующие этапы преобразования субстрата. При низких температурах снижение скорости ферментативной реакции связано с уменьшением доли активных молекул фермента, при высоких температурах — с глубокими конформационными изменениями активного центра.

Установлено, что для иммобилизованной β -фруктофуранозидазы оптимальная температура гидролиза субстрата смещается в сторону более высоких значений с максимальной активностью при 70 °С (рис. 3), что на 20 °С выше, чем для свободного фермента. Максимальная активность свободного фермента при оптимальных для него температуре и рН составила 9978,0 ед/мг белка, а иммобилизованной β -фруктофуранозидазы — 6984,6 ед/мг белка.

Можно предположить, что повышение оптимальной температуры реакции гидролиза сахарозы для иммобилизованной β -фруктофуранозидазы обусловлено тем, что при присоединении к носителю происходит повышение жесткости третичной структуры, ответственной за каталитическое превращение субстрата. Чем больше образовано связей между носителем и ферментом, тем стабильность белковой молекулы выше по отношению к температуре [12, 13].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Сергеева Н. К.* // Хранение и переработка сельхозсырья. 2008. № 10. С. 72—73.
2. *Петрович Ю. А., Зубцов В. А., Трусова Н. Ф.* // Стоматология. 1991. Т. 70. № 3. С. 76—80.
3. *Тырсин Ю. А.* Использование полидекстрозы и инулина в приготовлении кремовых начинок для шоколадных изделий // VI Междунар. научно-практ. конф. «Технологии и продукты здорового питания. Функциональные пищевые продукты». Сборник докладов. Ч. 2. Москва: Издательский комплекс МГУПП, 2008. С. 36—39.
4. *Шереметова С. Г., Полянский К. К., Котов В. В.* // Молочная промышленность. 2008. № 3. С. 74.
5. *Жеребцов Н. А., Абрамова И. Н., Шеламова С. А.* // Биотехнология. 2002. № 3. С. 13—20.
6. *Davies R.* // J. Gen. Microbiol. 1971. V. 66. № 1. P. 37.
7. *Lowry O. H., Resebrough N. J., Farr A. L., et al.* // J. Biol. chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265—275.
8. *Chibata I.* // Pure and Appl. Chem. 1978. V. 50. № 7. P. 667—675.
9. Методы биохимических исследований растений / Под ред. Ермакова А. И., 3-е изд., перераб. и доп. — Л.: Агропромиздат Ленинградское отделение? 1987. С. 430.
10. *Somogyi M. J.* Determination of reducing sugar // J. Biol. Chem. 1952. V. 195. № 1. P. 19—28.
11. ГОСТ 10896-78. Иониты. Подготовка к испытанию.
12. 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.
13. *Тривен М.* Иммобилизованные ферменты. М.: Мир, 1983. 213 с.

Калач Елена Владимировна — аспирант, кафедра пищевой биотехнологии и переработки животного и рыбного сырья, Воронежская государственная технологическая академия; тел.: (473) 2553751, e-mail: a_kalach@mail.ru

Балакина М. Е. — магистр, кафедра аналитической химии, Воронежский государственный университет; тел.: (473) 2208932

Kalach Elena V. — post-graduate student, chair of food biotechnology and processing of animal and fish raw materials, Voronezh State Technological Academy; tel.: (473) 2553751, e-mail: a_kalach@mail.ru

Balakina M. E. — master, analytical chemistry chair, Voronezh State University; tel.: (473) 2208932