

УДК 543.94+577.151.03

ЖЕЛАТИН И КРАХМАЛ: ЧТО ЛУЧШЕ СТАБИЛИЗИРУЕТ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ?

© 2020 г. Е. Н. Есимбекова^{1,2,*}, А. Е. Говорун², В. И. Лоншакова-Мукина², В. А. Кратасюк^{1,2}

Представлено академиком РАН А.Г. Дегерменджи 16.11.2019 г.

Поступило 30.11.2019 г.

После доработки 30.11.2019 г.

Принято к публикации 30.11.2019 г.

Рассмотрены закономерности функционирования ряда ферментов в вязком окружении, созданном природными полимерами крахмалом и желатином. На основе анализа кинетических кривых термоинактивации предложены механизмы термоинактивации ферментов в вязком микроокружении. На примере бутирилхолинэстеразы, НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы и биферментной системы светящихся бактерий НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза найдены условия, в которых крахмал и желатин оказывают стабилизирующий эффект на активность ферментов при хранении и воздействии различных физических и химических факторов среды. Значительное усиление стабилизирующего эффекта достигается исключением воды при высушивании иммобилизованных в полимерные гели крахмала и желатина ферментных препаратов.

Ключевые слова: стабилизация ферментов, термоинактивация ферментов, крахмал, желатин, бутирилхолинэстераза, люцифераза, НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза

DOI: 10.31857/S2686738920020110

Невысокая стабильность белковых макромолекул ферментов ограничивает область их практического применения. В связи с этим поиск возможных путей повышения стабильности ферментов является важной задачей. При этом принимаются во внимание два различных аспекта проблемы: термодинамическая (или конформационная) стабильность и кинетическая (или долговременная) стабильность. Одним из способов повышения стабильности ферментов является добавление стабилизаторов [1]. Универсальным методом, применяемым для повышения как термодинамической, так и кинетической стабильности является иммобилизация. При этом для стабилизации разных ферментов необходимо подбирать свое уникальное микроокружение. В последние годы стали популярны исследования стабилизации белковых макромолекул в условиях “молекулярного краудинга”, то есть в условиях исключенного объема окружающей свободной воды [2–4]. Стабилизация белковых молекул при иммобилизации в полимерные гели и помещении в среды с повышенной вязкостью до-

стигается именно благодаря вышеупомянутому эффекту [5]. К настоящему времени достаточно хорошо изучены физико-химические и структурные свойства гелей и вязких растворов природных биополимеров: желатина и крахмала [6, 7]. Кроме того, существуют подтверждения благоприятного воздействия микроокружения, создаваемого данными биополимерами, на молекулы ферментов [8–10].

В работе на примере ферментов бутирилхолинэстеразы (BChE), НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы (Red) и биферментной системы светящихся бактерий НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза (Red + Luc) изучены особенности функционирования ферментов при помещении в вязкие растворы и гели природных биополимеров крахмала и желатина. Показано, что крахмал и желатин при некоторых условиях способны оказывать стабилизирующий эффект на функционирование ферментов при хранении и воздействии различных физических и химических факторов среды. Полученные результаты важны для разработки высокостабильных ферментных препаратов для применения в биологических анализах, в частности, биотестирования природных, сточных вод и водных растворов.

В работе использовали следующие реактивы: ФМН (“Serva”, Германия), НАДН (“Gerbu”, Германия), тетрадеканаль (“Merck”, Германия), S-бу-

¹ Институт биофизики Сибирского отделения
Российской академии наук, Красноярск, Россия

² Сибирский федеральный университет, Красноярск,
Россия

*e-mail: esimbekova@yandex.ru

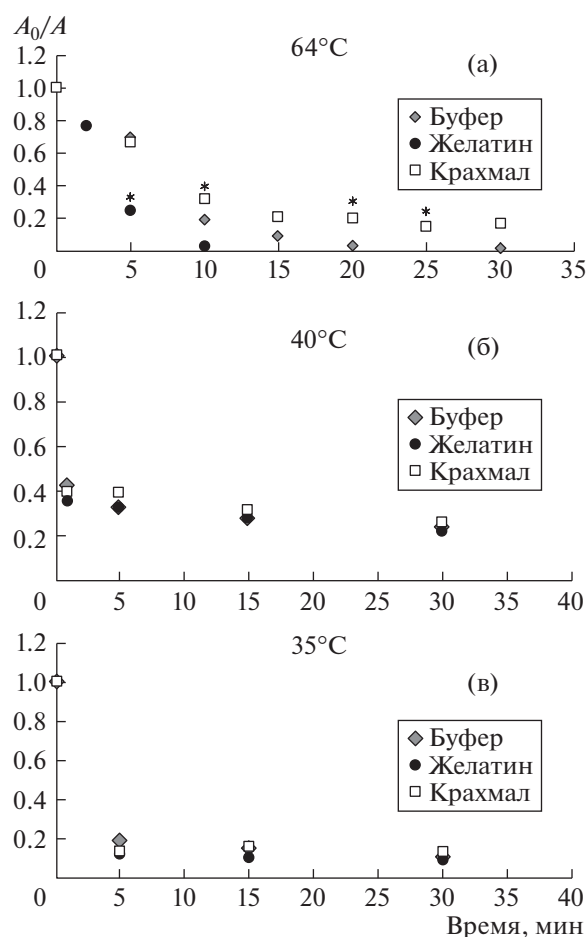


Рис. 1. Зависимости остаточной активности ферментов от времени выдерживания в буферном растворе без добавок и с добавлением крахмала и желатина: а) ВChE (концентрации желатина и крахмала составляют 1.4% и 3% соответственно), б) Red (концентрации желатина и крахмала составляют 1 и 2% соответственно), в) Red + Luc. (концентрации желатина и крахмала составляют 0.5 и 2% соответственно). * $p < 0.05$ по сравнению с остаточной активностью в буфере.

тирилтиохолин йодид и 5-5'-дитиобис (2-нитробензойную кислоту) ("Sigma", Германия); лиофилизированные препараты НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы (КФ 1.5.1.29) из *Vibrio fischeri*, биферментной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы и люциферазы (КФ 1.14.14.3) из рекомбинантного штамма *E. coli* (производства лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН, Красноярск), бутирилхолинэстеразы из лошадиной сыворотки ("Sigma", Германия).

Активность Red определяли спектрофотометрическим методом по скорости расходования НАДН [11]. Активность биферментной системы Red + Luc определяли по величине максимальной интенсивности свечения $I_{\text{макс}}$, выраженной в относительных единицах [10]. Активность

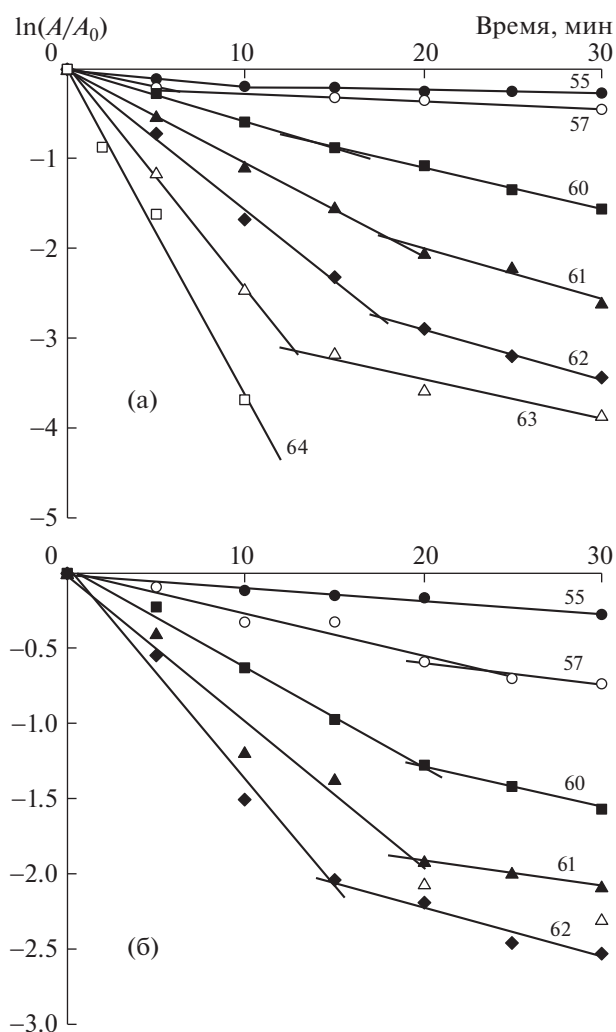


Рис. 2. Кинетические зависимости термоинактивации ВChE в 1.4%-м растворе желатина (а) и 3%-м растворе крахмала (б) при различных температурах.

ВChE определяли, как скорость гидролиза субстрата S-бутирилтиохолина йодида в растворе, содержащем 5-5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) [12].

Были получены кинетические зависимости остаточной активности ферментов (A/A_0) при инкубации ферментов от 0 до 30 мин в 0.05 М калий-фосфатном буферном растворе без добавок, а также в буферных растворах крахмала и желатина различной температуры (рис. 1). Видно, что раствор крахмала оказывает больший стабилизирующий эффект на ВChE по сравнению с желатиновым раствором. Так, например, в крахмальном окружении при температуре 64°C остаточная активность ВChE сохраняется в течение 30 мин, а в желатиновом окружении в течение 10 мин (рис. 1а). В то же время остаточная активность Red и

Таблица 1. Эффективные константы скоростей первой (k_1 , мин⁻¹) и второй (k_2 , мин⁻¹) стадий температурной инактивации ВChE в буферном растворе без добавок (контроль) и с добавлением желатина и крахмала при разных температурах ($M \pm m$, $n = 3$)

$T, ^\circ\text{C}$	Буфер		Желатин 1.4%		Крахмал 3%	
	$k_1 \cdot 10^3$	$k_2 \cdot 10^3$	$k_1 \cdot 10^3$	$k_2 \cdot 10^3$	$k_1 \cdot 10^3$	$k_2 \cdot 10^3$
55	47 ± 2	19 ± 1	$19.5 \pm 1.6^*$	$3.8 \pm 0.6^*$	$12 \pm 2^*$	$11.0 \pm 1.4^*$
57	58 ± 2	32 ± 3	$38 \pm 2^*$	$9.0 \pm 0.8^*$	$24 \pm 3^*$	$7.7 \pm 1.3^*$
60	53 ± 3	53 ± 4	49 ± 5	46 ± 7	$67 \pm 9^*$	$28 \pm 3^*$
61	114 ± 5	48 ± 5	104 ± 5	56 ± 5	$98 \pm 8^*$	$17 \pm 2^*$
62	185 ± 18	47 ± 20	158 ± 11	$110 \pm 8^*$	$142 \pm 18^*$	33 ± 3
64	174 ± 25	92 ± 7	$456 \pm 50^*$	—	$111 \pm 9^*$	$21 \pm 2^*$

* $p < 0.05$ по сравнению с контрольными значениями при соответствующей температуре, — для данной температуры в желатине наблюдается псевдопервый порядок константы скорости температурной инактивации.

Red + Luc при выдерживании ферментов в вязких растворах крахмала и желатина различной температуры не отличается от таковой в буферном растворе (рис. 1б, 1в).

На основании полученных экспериментальных данных были построены кинетические кривые термоинактивации ферментов в буферном растворе и вязких растворах крахмала и желатина. Все полученные зависимости в координатах уравнения первого порядка имеют вид кривых с “изломом”, что характерно для диссоциативного механизма термоинактивации олигомерных ферментов [13]. Начальные отрезки кинетических кривых соответствуют процессу диссоциации фермента на субъединицы (“быстрая инактивация”), а вторые линейные участки — процессу денатурации отдельных субъединиц (“медленная инактивация”). На рис. 2 в качестве примера приведены кинетические кривые термоинактивации ВChE в растворах желатина и крахмала при различных температурах. Для Red и биферментной системы Red + Luc получены сходные зависимости.

Из кинетических зависимостей термоинактивации ферментов были рассчитаны эффективные константы скорости термоинактивации k_1 и k_2 для “быстрой” и “медленной” стадий инактивации ферментов, соответственно, представляющие собой тангенс угла наклона кривых термоинактивации. В таблице 1 для примера приведены значения k_1 и k_2 , полученные при анализе кривых термоинактивации ВChE. Видно, что стабилизирующий эффект крахмала выражается замедлением как первой, так и второй стадий инактивации фермента. Для Red и Red + Luc не выявлено достоверных различий между значениями k_1 и k_2 для ферментов, функционирующих в буфере и растворах крахмала или желатина.

Таким образом, среди изученных ферментных систем повышение термодинамической стабиль-

ности при воздействии высоких температур ($>60^\circ\text{C}$) наблюдали только для ВChE в растворе крахмала.

Сравнение полученных результатов с литературными данными указывает на то, что термодинамическая и кинетическая стабильность ферментов может быть расширена введением дополнительной процедуры высушивания ферментов при их иммобилизации в гели крахмала и желатина. Так, в работе [14] показано, что высушивание биферментной системы Red + Luc, иммобилизованной в гели крахмала и желатина, существенно повышает ее устойчивость к химическим и физическим факторам среды: наблюдается расширение pH-оптимума в кислую и щелочную области, сохраняется высокая активность ферментов при увеличении концентраций солей, повышается термостабильность. Показана высокая стабильность ферментных препаратов, представляющих собой высушенные крахмальные или желатиновые диски, в процессе хранения: активность препаратов ВChE, представляющих собой высушенные крахмальные диски, сохранялась более 300 суток [12], а активность препаратов Red + Luc в виде желатиновых дисков — не менее двух лет [10].

Таким образом, с целью достижения термодинамической и кинетической стабильности ферментов более предпочтительным является использование в качестве стабилизирующей добавки крахмала. Исходя из совокупности представленных результатов и литературных данных можно сделать вывод, что ключевым фактором стабилизации ферментов путем включения в полимерные гели крахмала и желатина является исключение воды при высушивании иммобилизованных ферментных препаратов. Полученные результаты являются основой для получения высокоактивных и стабильных ферментных препаратов для биологических анализов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки в рамках научных проектов № 18–44–243010 “Стабилизация биферментной системы светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза + люцифераза путем помещения в гели и вязкие растворы биополимеров с целью усовершенствования реагента, используемого для оценки уровня загрязнения окружающей среды” и № 18–44–242003 “Конструирование ферментативного реагента для биоломинесцентного анализа: механизмы увеличения чувствительности и точности”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lonshakova-Mukina V., Esimbekova E., Kratasyuk V.* // *Sensors and Actuators B-Chemical*. 2015. V. 213. P. 244–247.
2. *Cheung M.S., Klimov D., Thirumalai D.* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005. V. 102. P. 4753–4758.
3. *Stagg L., Zhang S.Q., Cheung M.S., et al.* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007. V. 104. P. 18976–18981.
4. *Makowski L., Rodi D.J., Mandava S., et al.* // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 375. № 2. P. 529–546.
5. *Ragoonanan V., Aksan A.* // *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2007. V. 34. P. 246–252.
6. *Djabourov M.* // *Contemporary Physics*. 1988. V. 29. № 3. P. 273–297.
7. *Copeland L., Blazek J., Salman H., et al.* // *Food Hydrocolloids*. 2009. V. 23. P. 1527–1534.
8. *Munjal N., Sawhney S.K.* // *Enzyme and Microbial Technology*. 2002. V. 30. № 5. P. 613–619.
9. *Hoffmann I., Silva V.D., Nascimento M.G.* // *Journal of Brazilian Chemical Society*. 2011. V. 22. № 8. P. 1559–1567.
10. *Bezrukikh A., Esimbekova E., Nemtseva E., et al.* // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014. V. 406. № 23. P. 5743–5747.
11. *Говорун А.Е., Есимбекова Е.Н., Кратасюк В.А.* // *ДАН*. 2019. Т. 486. № 4. С. 500–503.
12. *Лоншакова-Мукина В.И., Есимбекова Е.Н., Кратасюк В.А.* // *ДАН*. 2018. Т. 479. № 4. С. 460–463.
13. *Полторак О.М., Чухрай Е.С.* // *Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология*. 1986. Т. 5. С. 50–86.
14. *Есимбекова Е.Н., Торгашина И.Г., Кратасюк В.А.* // *Биохимия*. 2009. Т. 74. № 6. С. 853–859.

GELATIN AND STARCH: WHAT PROMOTES BETTER STABILIZATION OF ENZYMES?

E. N. Esimbekova^{a,b,*}, A. E. Govorun^b, V. I. Lonshakova-Mukina^b, and V. A. Kratasyuk^{a,b}

^a *Institute of Biophysics Siberian Branch of RAS, Krasnoyarsk, Russia*

^b *Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia*

^{*}*e-mail: esimbekova@yandex.ru*

Presented by Academician of the RAS A.G. Degermendzhi November 16, 2019

The regularities of the functioning of a number of enzymes in a viscous environment created by the natural polymers of starch and gelatin are examined. Based on the analysis of kinetic curves of thermal inactivation, mechanisms of thermal inactivation of enzymes in a viscous microenvironment are proposed. Conditions when starch and gelatin have a stabilizing effect on enzyme activity during storage and exposure to various physical and chemical environmental factors were found for butyrylcholinesterase, NAD(P)H:FMN-oxidoreductase and a coupled system of luminous bacteria NAD(P)H:FMN-oxidoreductase + luciferase. A significant increase in the stabilizing effect is achieved by eliminating water by drying enzyme preparations immobilized in polymer gels of starch and gelatin.

Keywords: enzyme stabilization, thermal inactivation of enzymes, starch, gelatin, butyrylcholinesterase, luciferase, NAD(P)H:FMN oxidoreductase