

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ РАСТИТЕЛЬНЫХ
ПОЛИМЕРОВ»**

Е.Ю. Демьянцева, Р.А. Копнина

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ КАТАЛИЗ В ЦБП

Учебно-методическое пособие

Санкт-Петербург

2014

УДК 541.64
ББК 35.71я 7
О 352

Демьянцева Е.Ю., Копнина Р.А. Ферментативный катализ в ЦБП:
учебно - методическое пособие/СПбГТУРП. СПб., 2014. – 47 с.

Учебное пособие содержит основную информацию об энзимах, ферментативном катализе, условиях протекания реакций, катализируемых ферментами, роли ферментов в целлюлозно – бумажном производстве. Рекомендовано для студентов СПбГТУРП, обучающихся по направлению подготовки 18.03.01 и 18.04.01 «Химическая технология».

Рецензенты: канд. хим. наук, доцент кафедры общей и неорганической химии
СПбГТУРП Г.В. Пругло.

канд. хим. наук, доцент кафедры физической и коллоидной
химии СПбГТУРП Осовская И.И.

Рекомендовано к изданию Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебно – методического пособия.

Редактор и техн. редактор Л.Я. Титова.

Темплан 2014, поз. 55

Подп. к печати 25.09.2014. Формат 60х84/16. Бумага тип №1. Печать
офсетная. 3,0 уч.-изд.л.; 3,0 печ.л. Тираж 25 экз. Изд. № 55. Заказ

Ризограф Санкт-Петербургского государственного технологического
университета растительных полимеров, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана
Черных, 4

© Санкт-Петербургский
государственный технологический
университет растительных
полимеров, 2014
© Демьянцева Е.Ю., Копнина Р.А.
2014

Оглавление

Введение.....	4
1. Механизм ферментативного катализа.....	5
2. Свойства ферментов как биологических катализаторов.....	8
3. Ферментативная активность.....	10
3.1. Способы выражения активности энзимов.....	12
3.2. Способы определения ферментативной активности.....	13
4. Ферменты в целлюлозно-бумажной промышленности.....	17
5. Гидролитические ферменты.....	18
5.1. Амилолитические ферменты.....	19
5.1.1. Определение амилолитической активности (АС). Колориметрический метод по ГОСТ 20264,4-74.....	21
5.1.2. Влияние различных добавок на термостабильность амилолитического ферментного препарата.....	24
5.2. Ксиланазы.....	28
5.2.1. Определение ксиланазной активности фотоколориметрическим экспресс - методом с применением окрашенного субстрата.....	31
5.3. Липолитические ферменты.....	32
5.3.1. Определение активности фермента липазы.....	35
5.3.2. Определение активности липазы по модифицированному методу Ота-Ямада.....	37
6. Микрогетерогенные ферментативные реакционные среды.....	39
6.1. Влияние эмульгаторов на активность липазы.....	42
6.2. Гидролиз оливкового масла панкреатической липазой, включенной в обращённые мицеллы.....	44
Библиографический список.....	47

Введение

Ферменты (от лат. *fermentum* — закваска, брожение), или энзимы (от греч. *en zyme*-в дрожжах), являются веществами белковой природы, которые используются живыми организмами для катализа многих химических реакций. Все ферменты (в настоящее время их более 3000) были разделены международной комиссией по ферментам в 1976 г. на различные классы (оксиредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы) в соответствии с теми химическими реакциями, которые они катализируют. Каждый класс состоит из подкласса, уточняющего природу субстрата, кофермента или характер превращения.

В целлюлозно-бумажной промышленности (ЦБП) в настоящее время получили применение некоторые ферменты, такие как α -амилаза (модифицирует крахмал для обёрточной бумаги), целлюлаза (для удаления чернил с поверхности бумаги), ксиланаза (используется при предварительной обработке перед стадией отбеливания, позволяет существенно сократить расходы хлорсодержащих химикатов), гемицеллюлаза (также применяется в качестве реагента для «биоотбеливания»), липаза (уменьшает отложения липких компонентов древесины на оборудовании, способствует удалению офсетной краски). Перспективными ферментами для применения являются эндоцеллюлазы (для улучшения характеристики древесных волокон) и оксиредуктазы (для усиления действия отбеливающих агентов, действующих вместе с кислородом или перекисью водорода).

Источником фермента может служить любой живой объект. Поэтому ферменты могут быть как растительного, так и животного происхождения. В настоящее время для получения ферментов и ферментных препаратов используют микроскопические грибы, бактерии и дрожжи. Так, например, на данный момент выделены липазы из 34 различных источников, из которых 18 видов - из плесневых грибов и 7 - из бактерий.

1. Механизм ферментативного катализа

Ферменты являются замечательными катализаторами, осуществляющими с большой скоростью и 100%-м выходом такие химические реакции, которые трудно провести в лаборатории.

Главной особенностью ферментативной реакции является то, что она протекает в составе активного комплекса, образованного в результате связывания субстрата с определённым участком молекулы фермента (активным центром или центром связывания), к которому субстрат обладает специфическим сродством. Это взаимодействие обычно стабилизируется образованием ряда связей между группировками молекулы субстрата и определённым образом расположенными группами фермента. Взаимодействие между ферментом и субстратом может осуществляться с помощью ковалентных и водородных связей, электростатических и гидрофобных сил и т.д. Активный центр является, следовательно, весьма сложной структурой, которая может составлять существенную часть молекулы фермента; часто он имеет форму щели, в которой размещается субстрат. Поскольку фрагменты субстрата связываются с конкретными участками активного центра фермента, субстрат фиксируется на ферменте, принимая определенную конфигурацию.

Конечно, в реакции могут участвовать разные субстраты; они специфически связываются с расположенными поблизости участками активного центра и удерживаются в такой взаимной ориентации, которая наиболее благоприятна для их взаимодействия друг с другом.

Связывание субстрата с активным центром фермента должно быть достаточно легко обратимым, в противном случае активный центр окажется заблокированным первой же присоединившейся молекулой субстрата, и каталитический цикл не сможет осуществиться. Поэтому, несмотря на значительные различия в эффективности фермент-субстратных взаимодействий в различных системах, связывание между группами

фермента и соответствующими группами субстрата должно быть довольно слабым. В то же время наличие большого числа одновременно взаимодействующих групп обеспечивает достаточно высокое сродство. Для этого различные группы фермента должны быть расположены надлежащим образом, чтобы связывание их с группами субстрата могло осуществляться одновременно. Это является основой специфичности фермента, соответствия между ферментом и субстратом по типу «замок-ключ».

Можно легко показать, что реакции, катализируемые подавляющим большинством ферментов, обратимы, т.е. данный фермент катализирует реакцию в обоих направлениях. Отсюда следует, что активный центр фермента может специфически связывать как субстрат, так и продукт; связанный реагент активируется и оказывается способным к соответствующему превращению. Молекулы субстрата и продукта несколько различаются по форме, и напрашивается вывод, что при превращении одного в другой образуется соединение, имеющее «промежуточную» форму. Весьма заманчиво предположить, что активный центр фермента комплементарен именно этому интермедиату. Активный центр не может одновременно точно соответствовать и субстрату, и продукту, без некоторого изменения своей структуры; при взаимодействии с активным центром субстрат или продукт приближаются по своей конформации к интермедиату и таким образом активируются для определенной трансформации. Чтобы различные группы субстрата (или продукта), участвующие в связывании, могли взаимодействовать с соответствующими группами фермента, должно произойти некоторое изменение как субстрата, так и фермента; масштаб этих изменений зависит от жёсткости химических структур молекул фермента и субстрата. В изменении конформации активного центра, в который входят группировки из различных участков пептидной цепи, сближенные благодаря ее характерной укладке, определённую роль играет гибкость всей белковой молекулы.

Для современных представлений о химических аспектах ферментативных реакций характерна четко выраженная тенденция опираться на химические свойства самого субстрата. Это вполне естественно: несмотря на всю сложность, в действии ферментов нет ничего таинственного и в основе ферментативных реакций, несомненно, лежат обычные химические процессы. При этом следует понимать, что по существу речь идёт о свойствах не свободного субстрата, а совершенно другого соединения – фермент – субстратного комплекса, который может обладать новыми свойствами. В составе комплекса группы субстрата взаимодействуют с определёнными группами фермента, конформация субстрата в комплексе может отличаться от той, которую он имеет в свободном состоянии в растворе, и в нём могут возникать внутренние напряжения.

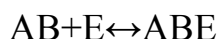
Механизмы химического и ферментативного катализа сходны. Доминирующей концепцией в современной науке является теория переходного состояния. Данная теория рассматривает два состояния реагентов – исходное (основное) и переходную структуру наименее стабильную, которой соответствует максимум энергии. Для вещества, находящегося в переходном состоянии, существует равная вероятность того, что достигшие его молекулы вступят в реакцию с образованием продукта реакции или вернутся обратно на уровень не прореагировавших молекул. Скорость любой химической реакции пропорциональна концентрации молекул, находящихся в переходном состоянии. Но переходного состояния может достичь только та часть молекул исходного вещества, которая обладает достаточной энергией для преодоления энергетического барьера.

Основная функция любого катализатора, в том числе фермента – снижение энергетического барьера реакции. Катализатор ускоряет химическую реакцию, находя «обходные пути», позволяющие молекулам преодолевать активационный барьер на более низком энергетическом уровне.

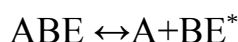
Согласно современным представлениям, снижение энергии активации достигается через образование фермент-субстратного комплекса, переходному состоянию которого соответствует более низкая энергия активации. Таким образом, в присутствии катализатора (фермента), значительная часть молекул данного субстрата вступает в реакцию в единицу времени.

Условно ферментативный процесс можно подразделить на 3 стадии:

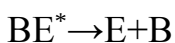
1. Стерическое связывание субстрата с активным центром – образование фермент-субстратного комплекса (на примере реакции $AB \rightarrow A+B$):



2. Преобразование первичного фермент-субстратного комплекса в активированный переходный комплекс:



3. Отделение конечного продукта от фермента:



Вторая стадия более медленная и лимитирует скорость всей химической реакции, она является собственно актом катализа, т.е. разрыва и образования новых связей. На этой стадии и происходит снижение энергии активации.

2. Свойства ферментов как биологических катализаторов

Ферменты, являясь катализаторами белковой природы, имеют некоторые сходства с небиологическими катализаторами:

1. Энзимы не входят в состав конечных продуктов реакции;
2. Такого рода катализаторы не смещают положения равновесия;
3. Ферменты не могут возбудить реакции, протекание которых противоречит законам термодинамики, они ускоряют только те реакции, которые могут протекать и без них.

Однако также имеются и некоторые специфические свойства:

1. По своей природе ферменты являются белками;
2. Ферменты обладают узкой специфичностью (избирательностью действия на субстраты). Биологическая функция фермента обусловлена наличием в его структуре активного центра, с которым взаимодействует определенный лиганд. Лиганд, взаимодействующий с активным центром фермента, называется субстратом.
3. Большинство катализируемых ферментами реакций высокоэффективны, они протекают в 10^8 - 10^{14} раз быстрее, чем некатализируемые реакции. Каждая молекула фермента способна за секунду трансформировать от 100 до 1000 молекул субстрата в продукт.
4. Конформационная лабильность. Каталитическая эффективность фермента, как и любой белковой молекулы, зависит от его конформации и, в частности, от конформации активного центра. В клетках имеются вещества, которые могут вызывать незначительные изменения конформации молекулы фермента за счет разрыва одних и образования других слабых связей; это может вызывать как повышение, так и снижение активности фермента.
5. Активность ферментов может регулироваться. Действие ферментов в клетке, как правило, строго упорядочено: продукт одной ферментативной реакции является субстратом другой; таким образом образуются метаболические пути. Среди множества ферментов практически каждого метаболического пути имеются ключевые, или регуляторные, ферменты, активность которых может изменяться в зависимости от потребности клетки в конечном продукте метаболического пути.
6. Оптимальные условия протекания ферментативных реакций: температура 37-38 °С; нормальное атмосферное давление, pH 6,9-7,7, характерное для большинства тканей.

3. Ферментативная активность

Для измерения каталитической активности ферментов используют такие показатели, как скорость реакции или активность фермента. *Скорость ферментативной реакции* определяется уменьшением количества молекул субстрата или увеличением количества молекул продукта за единицу времени. Скорость ферментативной реакции является мерой каталитической активности фермента и обозначается как *активность фермента*.

Для определения ферментативной активности прежде всего следует тщательно продумать метод, которым следует воспользоваться, поскольку ферментативная активность зависит от многих факторов: температура, pH среды, концентрации субстрата и кофакторов.

Так, например, для большинства известных в настоящее время ферментов определён оптимум pH, при котором они обладают максимальной активностью. Эта величина - важный критерий, служащий для характеристик фермента. Иногда это свойство ферментов используют для их препаративного разделения. Наличие оптимума pH можно объяснить тем, что ферменты представляют собой полиэлектролиты и их заряд зависит от значения pH. Иногда сопутствующие вещества могут изменить оптимум pH, например буферные растворы. В некоторых случаях в зависимости от субстратов ферменты с неярко выраженной специфичностью имеют несколько оптимумов. Например, пепсин расщепляет белки яйца при pH 1,5-2,0; синтетические субстраты - при pH 4,0. Отсюда следует, что величина (pH оптимум) - весьма чувствительный признак для данного фермента. Она зависит от природы субстрата, состава буферного раствора и поэтому не является истинной константой. Нужно иметь в виду также свойства ферментов как белковых тел, способных к кислотно-щелочной денатурации. Кислотно-щелочная денатурация может привести к необратимым изменениям структуры фермента с утратой его каталитических свойств.

Температура – один из важнейших факторов внешней среды, который независимо от состояния равновесия реакции меняет её скорость. Поэтому при ферментативных реакциях при повышении температуры на 100 °С процесс ускоряется в 1,5 – 2 раза. При дальнейшем повышении температуры присоединяются денатурационные процессы, характерные для всех белков и в том числе для ферментов, поэтому наблюдается затухание скорости реакции. Температурным оптимумом реакции называют температуру, при которой одно её действие вызывает ускорение реакции, катализируемой данным ферментом. Для большинства ферментов животного происхождения он равен 400 – 500 °С, для растительного происхождения он равен 500 – 600 °С. Почти все ферменты разрушаются при температуре 800 С. Но для некоторых ферментов в настоящее время доказана возможность восстановления их каталитической активности в случае обратимого процесса денатурации белка.

Скорость любого ферментативного процесса в значительной степени зависит от концентрации как субстрата, так и фермента. Обычно скорость реакции прямо пропорциональна количеству фермента, при условии если содержание субстрата в пределах оптимума или немного выше. При постоянном количестве фермента скорость возрастает с увеличением концентрации субстрата. Эта реакция подчинена закону действующих масс.

Учитывая эти и другие факторы, при определении активности ферментов следует строго соблюдать постоянство условий проведения опыта. Также является целесообразным не ограничиваться одним способом определения.

О скорости ферментативной реакции судят или по скорости убыли субстрата, или по скорости образования субстрата. Количество субстрата, превращаемого в условиях испытания, должно быть пропорционально количеству фермента и времени инкубирования. Если же нет такой пропорциональности, то активность рассчитывают по предварительно построенному калибровочному графику, отражающему зависимость

скорости реакции от количества единиц фермента. Когда ход реакции нелинеен во времени, следует определять начальную скорость реакции (по тангенсу угла наклона касательной к начальному отрезку кривой превращения).

3.1. Способы выражения активности энзимов

Для выражения концентрации фермента и количественной оценки его активности в условных единицах Комиссией по ферментам Международного биохимического союза была рекомендована стандартная международная единица (Е или U): за единицу активности любого фермента принимается то количество его, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 микромоля субстрата или образование 1 микромоля продукта в минуту (мкмоль/мин) при оптимальных условиях (температура 37 °С, оптимальное значение рН раствора) проведения ферментативной реакции. Эти единицы активности используют в медицинской и фармацевтической практике для оценки активности ферментов:

$$1 \text{ E} = \frac{1 \text{ мкмоль превращенного субстрата}}{1 \text{ мин}} .$$

Например, если при инкубации 0,5 мл экстракта дрожжей с раствором аргинина за 15 мин разложилось 120 мкмоль аргинина, это означает, что в 0,5 мл экстракта содержится 120/15, т.е. 8 Е фермента аргиназы. Эта величина отражает *общую активность аргиназы*, содержащейся в 0,5 мл экстракта. Концентрацию фермента выражают в единицах на 1 мл (Е/мл). Если в 0,5 мл экстракта содержится 8 Е аргиназы, это значит, что концентрация фермента равна 8:0,5, т.е. 16 Е/мл.

Для оценки количества молекул фермента среди других белков данной ткани определяют удельную активность (Уд.Ак.) фермента, численно равную количеству превращенного субстрата (в мкмольях) за единицу времени одним

миллиграммом (мг) белка (фермента, выделенного из ткани) и по которой судят о степени очистки фермента (чем меньше посторонних белков, тем выше удельная активность):

$$\text{Уд. Ак.} = \frac{1 \text{ мкмоль превращенного субстрата}}{1 \text{ мин} \times \text{количество белка (мг)}} = \frac{E}{\text{количество белка (мг)}} .$$

Например, если в 0,5 мл экстракта, содержащего 8 Е аргиназы, обнаружено 20 мг белка, это значит, что удельная аргиназная активность экстракта равна $8:20=0,4$ Е/мг.

Для сопоставления каталитической активности разных ферментов определяют молекулярную активность (число оборотов), которая соответствует числу молекул субстрата, превращаемых одной молекулой фермента за 1 мин. Молекулярную активность фермента можно определить лишь в том случае, если известна молекулярная масса фермента и его молекулярная концентрация в растворе - эти данные возможны только для ферментов, полученных в чистом (гомогенном состоянии).

В связи с решением XXI Генеральной конференцией по мерам и весам предложено новое выражение активности фермента в каталах (кат, kat): 1 кат есть каталитическая активность, способная осуществлять реакцию со скоростью, равной 1 моль субстрата в 1 с (1 моль/с). Отношение международной единицы (Е) к каталу можно выразить следующим образом: $1 \text{ кат} = 1 \text{ моль} \cdot \text{с}^{-1} = 60 \text{ моль} \cdot \text{мин}^{-1} = 60 \cdot 10^6 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} = 6 \cdot 10^7 \text{ Е}$ или $1 \text{ Е} = 1 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} = (1/60) \text{ мкмоль} \cdot \text{с}^{-1} = (1/60) \text{ мкат} = 16,67 \text{ нкат}$. Таким образом, 1 Е фермента соответствует 16,67 нкат.

3.2. Способы определения ферментативной активности

Спектрофотометрические методы. Спектрофотометрические методы основаны на поглощении света в определенных участках спектра многими соединениями, являющимися активными группами ферментов, субстратами

или продуктами реакции. Положение максимума поглощения при определенной длине волны определяется наличием в исследуемом материале определенных групп - аналитических форм. Для измерения спектров используют специальные приборы - спектрофотометры, фотометрические абсорбциометры и др. Этот метод отличается высокой чувствительностью, быстротой определения, малым расходом фермента и реактивов и позволяет следить за течением реакции во времени. Для этого реакционную смесь помещают в кювету, вставленную в термостатируемый кюветодержатель. Через малый промежуток времени после добавления фермента (или субстрата) и быстрого перемешивания измеряют поглощение при длине волны, характерной для используемого субстрата или конечного продукта, образующегося в данной реакции. С помощью спектрофотометрического метода можно измерять непосредственно концентрацию некоторых ферментов (после достаточной очистки) по величине характерных максимумов поглощения прочно связанных коферментов (простетических групп). Необходимо иметь произвольно выбранную единицу фермента, с помощью которой можно было бы количественно выразить чистоту и активность различных фракций. В большинстве случаев выбор единицы зависит от избираемого метода определения. В случае спектрофотометрического метода такой единицей может служить количество фермента, которое вызывает определенное изменение в оптической плотности за определенное время при данных условиях опыта; если определяется продукт реакции, то единицей будет количество фермента, которое вызывает образование определенного количества вещества в минуту и т.д. Тогда удельную активность фермента, которая является мерой чистоты ферментного препарата, выражают числом единиц в 1 мг вещества (белка).

Для целей определения ферментов могут быть использованы не только измерение поглощения света, но также измерения флюоресценции - *спектрофлюорометрические методы*. Такое определение активности

фермента в ряде случаев по чувствительности превосходит спектрофотометрические методы на целый порядок величины. Некоторые коферменты и субстраты обладают сильной флюоресценцией. НАД и НАДФ в восстановленном состоянии имеют сильную флюоресценцию и не флюоресцируют в окисленном состоянии. Поэтому спектрофлюорометрию используют для изучения кинетики и механизма действия никотинамидных и флавиновых ферментов.

Колориметрические (фотометрические) методы. В основе этих методов лежит измерение при помощи визуального или фотоэлектрического колориметра окрашенного продукта, образующегося при взаимодействии субстрата или продукта действия фермента со специфическими реактивами, которые обычно добавляются в фиксированную опытную пробу, взятую после остановки ферментативной реакции. Эти методы весьма разнообразны. Разработаны количественные методы, основанные на биуретовой реакции, при которой состав белка, очевидно, не должен сказываться на результатах определения, т.к. эта реакция на пептидные связи, а не на боковые группы в белке. Метод Горнелла и соавторов, основанный на измерении полосы поглощения в области 550-650 нм, используется для определения значительных количеств (1-10 мг) белка в пробе. Предлагаются биуретовые микрометоды, основанные на поглощении ультрафиолетовых лучей медно-белковыми комплексами: они позволяют определять 0,1 – 2,0 мг белка в пробе. Число небелковых веществ, которые могут влиять на определения с помощью биуретовой реакции, невелико, но следует вносить поправки на те вещества, которые присутствуют в высоких концентрациях (соли аммония, сахара). Наиболее ценными являются те фотометрические методы, которые позволяют следить во времени за ходом ферментативной реакции без ее прекращения по изменению окраски хромогенного субстрата или добавленного индикатора. Метод Фолина и Чиокальто, предложенный для определения количества белка, основан на хромогенной природе некоторых боковых групп аминокислот, а также на присутствии в белках пептидных

связей. Этот метод обладает высокой чувствительностью (на пробу достаточно 0,01 - 0,1 мг белка), но многие небелковые вещества мешают определению.

В настоящее время для определения количества белка широко пользуются измерениями интенсивности поглощения света при 280 нм, которое обусловлено присутствием в белке ароматических аминокислот. Количество этих аминокислот в разных белках различно и, следовательно, интенсивность неодинакова. В кювете толщиной 1 см у раствора, содержащего 1 мг “усредненного” белка в 1 мл, оптическая плотность равна 1 при длине волны 280 нм. Нуклеиновые кислоты поглощают при 280 нм, но можно сделать поправку на их присутствие, проводя измерения и при 260 нм, и при 280 нм. Очень важна быстрота измерения активности ферментов. То же относится и к измерению количества сухого остатка или количества белка. Тем самым предпочитают быстрый метод определения белка путем измерения величины поглощения при 280 нм. Выигранное время важнее, за счет того, что удельное поглощение выделяемого белка иногда значительно отличается от средней величины поглощения смеси белков, присутствовавших в исходном материале.

Манометрические методы. Эти методы используются при определении активности фермента в тех случаях, когда в исследуемых реакциях один из компонентов находится в газообразном состоянии. К таким реакциям относятся главным образом те, которые связаны с процессами окисления и декарбоксилирования, сопровождающимися поглощением или выделением кислорода и углекислоты, а также реакции, в которых выделение или связывание газа происходит в результате взаимодействия продуктов ферментативного превращения с добавленным в систему реактивом. Наблюдение за ходом реакции во времени проводится в специальных приборах - манометрических аппаратах Варбурга.

Другие методы. Сюда относится обширный ряд методов, включающих *поляризметрию, вискозиметрию, потенцио- и кондуктометрические*

измерения и т.п. Также определение активности можно выполнять, используя методы *хроматографии и электрофореза на бумаге*. Эти методы высокочувствительны и специфичны, что делает их во многих случаях незаменимыми; они позволяют значительно сократить расход фермента на измерение активности, но не всегда применимы ввиду продолжительности разделения веществ в процессе хроматографии (и электрофореза).

4. Ферменты в целлюлозно-бумажной промышленности

В настоящее время все более широкое применение в промышленности находят биокаталитические процессы с применением различных ферментов и ферментных препаратов. Попытки использовать ферменты в ЦБП предпринимались достаточно давно. Так, существует патент США 2280307 (1942 г.), где для повышения гидратации волокон при размоле было предложено использовать ферменты группы гемицеллюлаз. Однако набирать темп в развитии это направление начало лишь 20-25 лет назад.

За последнее десятилетие существенно расширился круг применяемых в бумажной промышленности ферментов: амилазы (удаление крахмалопродуктов, чернил, роспуск массы); ксиланазы (улучшение отбелки, размол); целлюлазы (удаление чернил, улучшение обезвоживания, модификация поверхности, размол); липазы (удаление смолы); эстеразы (предотвращение налипания); протеазы (удаление слизи).

Также в последние годы был достигнут определённый результат в использовании и других классов ферментов, например таких, которые разрушают пектин, - для контроля заряда и переработки анионных отходов; оксиредуктаз/лакказ — для повышения прочности ДВП и подобных продуктов. При переработке макулатуры ферменты в основном применяют для удаления чернил и крахмала, улучшения обезвоживания и контроля липкости.

Следует отметить и возможность совместного применения нескольких видов ферментов одновременно. Так, смесь целлюлаз и гемицеллюлаз позволяет регулировать фильтрующую способность бумажных масс при отливе на сеточном столе бумагоделательной машины и облегчить процесс размола грубых фракционированных волокон.

Большое достоинство ферментов по сравнению с традиционными химикатами – их экологическая безопасность. Ферменты – белковые соединения с молекулярной массой порядка 30 – 70 тыс., продукты жизнедеятельности целого ряда грибов, они легко усваиваются активным илом в биотенках.

Однако в противовес этому существуют и некоторые недостатки ферментативной обработки, ограничивающие её спектр применения: их разрушение при повышенных температурах; достаточно высокая величина молекул, что затрудняет их проникновение внутрь целлюлозного волокна.

5. Гидролитические ферменты

Гидролитические ферменты – важнейший класс ферментов, используемых при переработке органического сырья. Они применяются преимущественно в начальной стадии переработки органического сырья, когда необходимо расщепить структурные или запасные полимеры.

Класс гидролаз – третий класс в номенклатуре ферментов – включает в себя 13 подклассов, различающихся по типу гидролизуемой связи:

- 1) сложноэфирная связь (эстеразы: нуклеаза, фосфодиэстераза, липазы, фосфатазы и т.д.);
- 2) гликозидная связь (гликозидазы: α - и β -амилазы, целлюлазы, пектиназы, ксиланазы и др.);
- 3) простая эфирная связь;
- 4) пептидная связь (протеазы: трипсин, химотрипсин, тромбин и др.);

- 5) непептидная связь (уреаза, аргиназа);
- 6) кислотная ангидринная связь;
- 7) углерод-углеродная связь;
- 8) галогенная связь;
- 9) азотно-фосфорная связь;
- 10) азотно-серная связь;
- 11) углеродно-фосфорная связь;
- 12) дисульфидная связь;
- 13) сероуглеродная связь.

В целлюлозно – бумажной промышленности наиболее широкое применение нашли ферменты, относящиеся к первому и второму подклассам.

5.1. Амилолитические ферменты

Амилолитические ферменты принадлежат к классу гидролаз, ко второму их подклассу - гидролазам гликозидов. В целлюлозно-бумажной промышленности используется фермент α -амилаза, удаляющий продукты крахмала из вторичных волокон .

Крахмал является гомополимером глюкозы. Он представлен линейной (амилоза) и разветвлённой (амилопектин) разновидностью полимеров. Различные виды крахмала имеют разную температуру клейстеризации (ТК). Интервал этой температуры тем шире, чем разнороднее по размеру крахмальные зёрна. Повышение относительного содержания амилопектина приводит к снижению ТК. В пределах температурной зоны клейстеризации основная масса крахмальных гранул переходит в состояние геля, но часть крахмала, локализованного в центре гранул, остаётся нетронутой. Для полного вскрытия гранул необходимо нагревание при температуре до 120 °С. Частичный гидролиз крахмала ферментами в процессе клейстеризации

позволяет снизить температурный предел за счёт облегчённой деградации гранул.

В качестве субстрата при определении активности амилолитических ферментов применяют не нативный, а растворимый крахмал с меньшей молекулярной массой, так как его гидролиз протекает значительно быстрее. Растворимый крахмал получают при слабом воздействии кислот на крахмал при тепловой обработке.

В процессе ферментативного гидролиза крахмала образуются низкомолекулярные декстрины и небольшое количество мальтозы.

Группа ферментов, гидролизующих крахмал, включает: α -амилазу, β -амилазу, глюкоамилазу, α -глюкозидазу, изоамилазу, пуллуланазу. Все эти ферменты различаются по своим свойствам, распространению в природе и способу воздействия на крахмал. Для расщепления крахмала с образованием циклических продуктов реакции используют фермент циклодекстринглюканотрансферазу, относящуюся к классу трансфераз.

α -амилаза - (декстрогенамилаза, α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза) гидролизует α -1,4-глюкановые связи в полисахаридах, содержащих три и более остатков D-глюкозы. Это водорастворимый белок, обладающий свойствами глобулина и имеющий молекулярную массу порядка 45-60 КДа. α -амилаза содержится в культурах плесневых грибов и бактерий, в проросшем зерне пшеницы, ржи, ячменя т.д.; α -амилаза присутствует в слюне и поджелудочной железе. Её продуцентами являются бактерии *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus macerans*, *Vibrio cholerae* и *Shewanella*, а также грибы *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* и так далее.

Белок α -амилазы обладает слабокислыми свойствами, изоэлектрическая точка колеблется в пределах pH 4,2-5,7; α -амилаза является кальцийзависимым ферментом и обычно содержит от 1 до 4 атомов кальция. При кислотной или термической инактивации α -амилазы ионы Ca^{2+} оказывают стабилизирующее действие. По термостабильности α -амилазы

различаются в зависимости от их происхождения: грибная α -амилаза быстрее разрушается при повышенной температуре, α -амилаза солода более термостабильна, самой термоустойчивой α -амилазой является бактериальная. Однако её общий температурный оптимум около 66 °С.

Гидролиз крахмала под действием α -амилазы протекает в две стадии: короткая - предстационарная и длительная – стационарная. Во время первой стадии эндоамилаза быстро уменьшает молекулярную массу субстрата, образуя смесь линейных и разветвлённых олигосахаридов. Второй этап реакции продолжается пока продукты гидролиза не перестанут окрашиваться йодом, он протекает медленнее и зависит от индивидуальных свойств фермента и его природы. По этой причине конечные продукты гидролиза α -амилазами могут быть различными.

α -амилазы катализируют реакцию гидролиза крахмала, в результате которой образуются α -декстрины, мальтоза и глюкоза.

5.1.1. Определение амилолитической активности (АС).

Колориметрический метод по ГОСТ 20264,4-74

Метод основан на гидролизе крахмала ферментами амилолитического комплекса до декстринов различной молекулярной массы.

Амилолитическая активность характеризует способность амилолитических ферментов катализировать гидролиз крахмала до декстринов различной молекулярной массы и выражается числом единиц указанных ферментов в одном грамме препарата.

За единицу активности амилолитических ферментов принято такое число, которое в строго определённых условиях температуры, pH и времени действия катализирует до декстринов различной молекулярной массы 1 г растворимого крахмала или 30 % от введённого в реакцию вещества.

Необходимые реактивы: раствор крахмала 1 %; основной раствор йода; рабочий раствор йода.

Основной раствор йода. 0,5 г металлического йода и 5 г йодида калия помещают в бюкс, добавляют 2 см³ дистиллированной воды и закрывают притёртой крышкой. После полного растворения йода раствор переносят в мерную колбу на 200 см³ с пришлифованной пробкой, и объём жидкости доводят до метки дистиллированной водой. Основной раствор хранят в темноте и используют в течение месяца.

Рабочий раствор йода. 2 см³ основного раствора разводят 0,1 н раствором соляной кислоты в мерной колбе вместимостью 100 см³. Перед употреблением проверяют его оптическую плотность на ФЭК, применяя кюветы с рабочей длиной 10 мм и светофильтр с максимумом пропускания при $\lambda=453$ нм (синий). Оптическая плотность рабочего раствора должна быть равна на ФЭК 56-М – $0,220 \pm 0,01$. В случае отклонения от указанной величины ее приводят к необходимой добавлением нескольких капель 0,1 н раствора соляной кислоты и основного раствора йода.

Техника определения. В две пробирки диаметром 2 см и высотой 18 см наливают по 10 см³ 1%-го раствора крахмала и ставят в термостат или водяную баню с температурой $30 \pm 0,2$ °C на 5-10 минут.

Затем, не вынимая пробирок из термостата, наливают в первую 5 см³ дистиллированной воды (контрольная), во вторую – 5 см³ ферментного раствора (опытная).

Смеси быстро перемешивают и выдерживают в термостате 10 минут (по секундомеру). Затем из реакционных смесей (контрольного и опытного растворов) отбирают по 0,1 см³ раствора и переносят их в колбы, с 10 см³ рабочего раствора йода.

Содержимое колб перемешивают. Полученные растворы приобретают следующую окраску: контрольный – синюю, опытный – фиолетовую различной интенсивности в зависимости от количества непрогидролизованного крахмала.

Непосредственно после смешивания растворов определяют их оптическую плотность на фотоэлектроколориметре, используя светофильтр с максимумом светопропускания при $\lambda=656$ нм, пользуясь кюветами с толщиной поглощаемого свет слоя 1 см. Контрольным раствором при колориметрировании исследуемых растворов является дистиллированная вода.

Оптическая плотность контрольного раствора D_1 соответствует количеству исходного крахмала субстрата. Оптическая плотность опытного раствора D_2 соответствует количеству крахмала, оставшегося после действия фермента. Разница между показателями оптических плотностей растворов соответствует гидролизованному количеству крахмала субстрата.

Количество гидролизованного крахмала C (г) определяют по формуле

$$C = \frac{0,1 \times (D_1 - D_2)}{D_1}, \quad (1)$$

где 0,1-количество крахмала, взятого на испытание в качестве субстрата, г.

Если количество гидролизованного крахмала меньше 0,02 или больше 0,07 г, то испытания повторяют. Для этого при приготовлении рабочего раствора фермента берут большее или меньшее количество исходного раствора для разбавления.

Если в результате ферментативной реакции количество превращённого крахмала находится в указанных пределах, полученные данные используют для расчёта амилолитической активности или скорости гидролиза.

Обработка результатов.

Амилолитическую активность AC (ед/мл) препаратов бактериального происхождения определяют по формуле

$$AC = \frac{(5,885 \times C + 0,001671) \times 1000}{n}, \quad (2)$$

а амилолитическую активность препаратов грибного происхождения – по формуле

$$AC_1 = \frac{(7,264 \times C - 0,03766) \times 100}{n}, \quad (3)$$

где 5,885; 0,001671; 7,624; 0,03766 – коэффициенты расчётного уравнения, полученные при математической обработке экспериментальных данных зависимости количества гидролизованного крахмала от количества фермента, взятого для испытания (в коэффициенты введён множитель для пересчёта на 1 час действия фермента); C – количество прогидролизованного крахмала, г; 100; 1000 – коэффициент пересчёта миллиграммов в граммы; n – количество ферментного препарата, взятое для испытания, мг.

5.1.2. Влияние различных добавок на термостабильность амилолитического ферментного препарата

Цель работы: определить термостабильность раствора амилолитического фермента под влиянием добавок органической и неорганической природы.

Необходимые реактивы: раствор крахмала с концентрацией 1 %; ацетатный буферный раствор с pH 4,7; основной раствор йода; рабочий раствор йода; 1%-й раствор исследуемого препарата фермента.

Приборы и посуда: колбы плоскодонные; пипетки на 0,2; 1; 5 и 10 мл; мерный цилиндр; пробирки; кипящая водяная баня; термостат; фотоэлектроколориметр.

Ход работы:

1. Приготовление растворов фермента, содержащих добавки. В первую пробирку вносят 10 мл исходного раствора фермента и добавляют 110 мг хлорида кальция и тщательно перемешивают (концентрация хлористого кальция 10^{-1} моль/л). Во вторую пробирку вносят 10 мл исходного раствора фермента и добавляют 50 мг сорбита, тщательно перемешивают содержимое пробирки до полного растворения сорбита (концентрация сорбита – 0,5%). В третью пробирку вносят 10 мл

исходного раствора фермента. Сразу же после приготовления из всех полученных образцов отбирают по 1 мл и используют для проведения процесса гидролиза крахмала и определения исходной активности ферментного препарата. Далее пробирки закрывают воздушными холодильниками и ставят в термостат с температурой 65 °С на 60 мин; Через каждые 15 мин проводят отбор проб (по 1 мл), которые охлаждают до $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ и используют для гидролиза крахмала.

2. Гидролиз крахмала. Готовят 1%-й раствор крахмала и нагревают его до температуры 30 °С. Затем 1 мл ферментного препарата, прошедшего тепловую обработку, помещают в чистую пробирку, предварительно добавив в неё 2 мл 1%-го раствора крахмала, нагретого до $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Такую же процедуру повторяют со всеми испытуемыми растворами фермента. Содержимое каждой пробирки тщательно перемешивают и выдерживают в термостате при температуре 30 °С в течение 10 мин для прохождения процесса гидролиза. В полученных гидролизатах определяют количество прогидролизованного крахмала и амилалитическую активность. Для этого в колбы вносят по 10 см³ рабочего раствора йода, затем переносят туда по 0,1 см³ гидролизата. Содержимое колб перемешивают. Полученные растворы приобретают следующую окраску: контрольный - синюю, опытный – фиолетовую различной интенсивности в зависимости от непрогидролизованного крахмала.

Непосредственно после смешивания растворов определяют их оптическую плотность на фотоэлектроколориметре, используя светофильтр с максимумом светопропускания при $\lambda=656\text{ нм}$ (640-690 нм), пользуясь кюветами с толщиной поглощающего свет слоя 1 см. Контрольным раствором при колориметрировании исследуемых растворов является дистиллированная вода.

Оптическая плотность контрольного раствора D_1 соответствует количеству исходного крахмала субстрата. Оптическая плотность

опытного раствора D_2 соответствует количеству крахмала, оставшегося после действия фермента. Разница между показателями оптических плотностей растворов соответствует гидролизованному количеству крахмала субстрата.

Количество гидролизованного крахмала C (г) определяют по формуле

$$C = \frac{0,1 \times (D_1 - D_2)}{D_1}, \quad (4)$$

где 0,1-количество крахмала, взятого на испытание в качестве субстрата, г.

Если количество гидролизованного крахмала меньше 0,02 или больше 0,07 г, то испытания повторяют. Для этого при приготовлении рабочего раствора фермента берут большее или меньшее количество исходного раствора для разбавления.

Если в результате ферментативной реакции количество превращённого крахмала находится в указанных пределах, полученные данные используют для расчёта амилолитической активности или скорости гидролиза.

Обработка результатов.

Амилолитическую активность AC (ед/мл) препаратов бактериального происхождения определяют по формуле

$$AC = \frac{(5,885 \times C + 0,001671) \times 1000}{n}, \quad (5)$$

где 5,885; 0,001671 – коэффициенты расчётного уравнения, полученные при математической обработке экспериментальных данных зависимости количества гидролизованного крахмала от количества фермента, взятого для испытания (в коэффициенты введён множитель для пересчёта на 1 час действия фермента); C – количество прогидролизованного крахмала, г; 1000 – коэффициент пересчёта миллиграммов в граммы; n – количество ферментного препарата, взятое для испытания, мг или мл.

Таблица для записи данных опытов:

Образец	Время тепловой обработки, мин	АС, ед./г	Примечания
Исходный раствор ферментного препарата	0		
	15		
	30		
	45		
	60		
Раствор ферментного препарата с добавкой хлористого кальция	0		
	15		
	30		
	45		
	60		
Раствор ферментного препарата, содержащий сорбит	0		
	15		
	30		
	45		
	60		

По полученным данным построить график зависимости активности ферментного препарата от времени тепловой обработки. Определить, какая из добавок (органической природы или неорганическая) в большей степени способствует сохранению активности ферментного препарата.

5.2. Ксиланазы

Ксиланаза представляет собой комплекс ферментов, задействованных в деградации гетерогенного полисахарида – ксилана. Основным является фермент эндо-1,4-ксиланаза, который катализирует распад ксилана до ксилоолигосахаридов. Другие ферменты, такие как ксилозидаза, L-арабинофуразидаза, глюкуронидаза и эстераза (ксиланацетилэстераза и ферилоилэстераза), выполняют полный гидролиз ксилоолигосахаридов до мономеров.

Ксиланазы представляют собой гликопротеины с молекулярной массой 6-80 кДа. Ферменты активны в диапазоне температур 40-60 °С и pH 4,5-6,5.

Ксилан является наиболее распространённым представителем гемицеллюлоз растительной биомассы. В связи с этим интерес к этому классу ферментов неуклонно растёт в связи с возможностью их применения в целлюлозно-бумажной промышленности. Ксиланазы продуцируются многими видами бактерий и грибов. Наиболее полно изучены бактериальные ферменты, включающие несколько видов *Bacillus* и актиномицетов, таких как *Thermoplasma fusca*; также хорошо изученными источниками ферментов являются грибы *Trichoderma sp.*, *Aspergillus sp.* и *Aureobasidium pullulans*. Известно, что микроскопический гриб *Trichoderma viride* 44-11-62/3 является активным продуцентом комплекса целлюлолитических и гемицеллюлолитических ферментов, в том числе и ксиланазы.

Явление сорбции гемицеллюлоз (ГЦ) на целлюлозные волокна давно привлекает внимание исследователей. Первые упоминания о нем относятся к 30-м годам XX века, когда было замечено, что размол целлюлозы в присутствии ксилана приводил к увеличению содержания его в бумаге на 2-3 %. Сорбция ксилана на целлюлозу в процессе сульфатной варки впервые была обнаружена шведскими учеными Ильнером и Энстремом в 1956 г.

При контакте целлюлозы с растворами ГЦ практически всегда происходит их сорбция на целлюлозных волокнах, целлюлоза способна

сорбировать ГЦ при высокой и низкой температуре, в процессе варки, отбелики, размола и даже холодного облагораживания. Теоретические аспекты этого явления рассмотрены в работах А.П. Трейманиса, В.С.Громова и др. Сорбция имеет важное практическое значение: от количества сорбированных ГЦ зависят выход целлюлозы и показатели ее механической прочности.

Интерес к явлению сорбции ГЦ вновь возник в 80-х годах XX века, когда финскими учеными было установлено, что ферменты ксиланазного типа гидролизуют остаточный ксилан, что способствует более легкому удалению лигнина при отбелке целлюлозы.

Это перспективное направление в технологии отбелики нашло быстрое и широкое промышленное применение. К 2001 году многие заводы в разных странах применяли ксиланазы для уменьшения расхода отбеливающих реагентов и снижения загрязнения окружающей среды. Обработка ферментами успешно используется как в обычных схемах отбелики, так и в схемах без применения элементарного хлора (ECF) или TCF-схемах.

По экономическим соображениям в целлюлозно-бумажной промышленности нашли применение гемицеллюлазные ферменты. Промышленность выпускает два вида гемицеллюлазных ферментов: эндо-1,4-β-D-ксиланазу и эндо-1,4-β-D - манназу, называемых соответственно ксиланазой и маннаназой. Наиболее широкое применение при отбелке целлюлозы нашли ксиланазы. Большинство имеющихся в настоящее время товарных ксиланаз имеют различную молекулярную структуру и по этой причине часто обладают различными свойствами. Характерно, что свойства, которые варьируются у разных ксиланаз, связаны с их стабильностью, числом каталитических циклов на единицу фермента, определяющим его дозировку, и интервалами значений pH и температуры, требующихся для деятельности фермента.

Промышленные ферменты добавляются к целлюлозной массе в соответствии с их каталитической активностью. Единица активности –

это число микромолей редуцирующего сахара (ксилозы), образующееся за 1 минуту, или число молей редуцирующего сахара, образующееся за 1 секунду в определенных стандартных условиях. Промышленные ферменты обычно стабильны при комнатной температуре в течение 6 месяцев. Для сохранения оптимальной активности длительное хранение ферментов необходимо проводить при низких температурах.

Благоприятное влияние ферментов при отбелке зависит от используемой схемы отбелки, содержания остаточного лигнина в целлюлозе, задаваемой конечной белизны и экологических интересов предприятия. Основная цель отбелки целлюлозы с участием ферментов направлена на снижение расхода хлорсодержащих химикатов в процессе отбелки и уменьшения содержания адсорбируемого органического галогена (АОГ) в сточных водах.

Ферменты ксиланазного типа катализируют гидролиз ксиланов, не затрагивая при этом целлюлозу (рис.1).

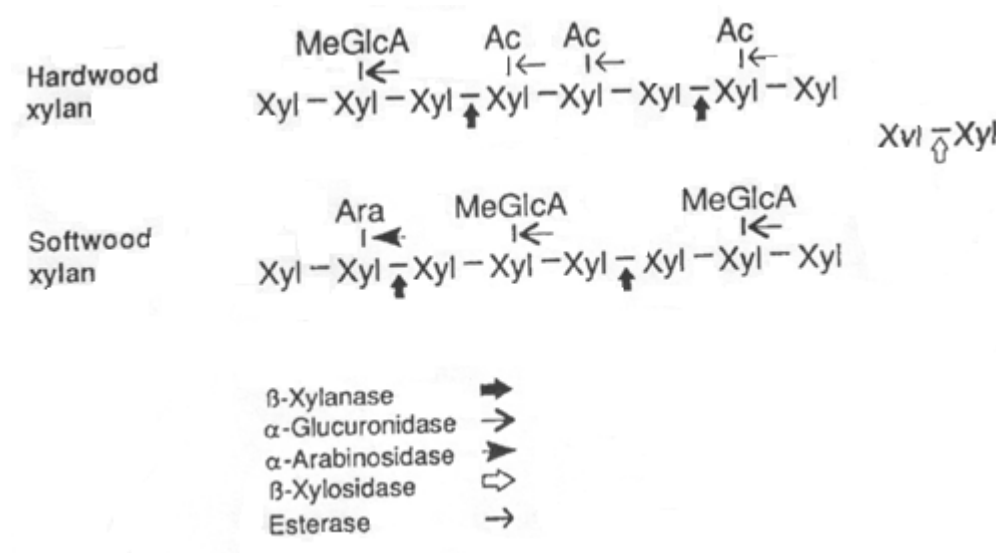


Рис. 1. Механизм действия различных ферментов на ксиланы древесины: Hardwood xylan – ксилан лиственной древесины; Softwood xylan – ксилан хвойной древесины

На действие ферментов влияет доступность субстрата: в нашем случае – матрицы целлюлозного волокна. Факторы, ограничивающие доступ ферментов к местам расположения ксилана - это особенности поверхностной структуры и размер пор волокон. Молекулярный размер и структура фермента также являются важными факторами, от которых зависит способность ферментов проникать во внутренние структуры волокон.

5.2.1. Определение ксиланазной активности фотоколориметрическим экспресс - методом с применением окрашенного субстрата

Метод основан на гидролизе окрашенного ксилана раствором ферментного препарата с последующим определением оптической плотности образовавшегося окрашенного растворимого продукта реакции.

За единицу ксиланазной активности в данном методе принято такое количество фермента, которое гидролизует 1 мкмоль гликозидных связей ксилана за 1 минуту при 40 °С в принятых условиях.

Необходимые реактивы: 0,5%-й раствор окрашенного ксилана; 0,1 М ацетатный буферный раствор с рН 4,5; ферментный раствор.

Техника определения. В пробирку вместимостью 45 см³ вносят 25 г окрашенного ксилана, приливают 4 см³ 0,1 М ацетатного буферного раствора и в течение 5 мин встряхивают на термостатируемой качалке при температуре 40 °С. Затем добавляют 1 см³ исследуемого ферментного раствора и инкубируют, вновь встряхивая 20 минут при той же температуре, после чего реакцию смесь 3 минуты центрифугируют или фильтруют через бумажный складчатый фильтр. Определяют оптическую плотность прозрачного фильтрата на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре при длине световой волны 490 нм в сравнении с контрольным раствором.

Последний готовят аналогично опытному, заменяя ферментный раствор 1 см³ 0,1 М ацетатного буферного раствора с pH 4,5.

Раствор ферментного препарата в ацетатном буфере готовят такой концентрации, чтобы после проведения ферментативной реакции и последующего колориметрирования оптическая плотность исследуемого раствора находилась в интервале 0,3-0,8.

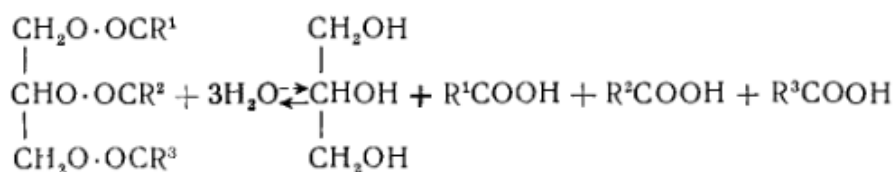
Обработка результатов. Ксиланазную активность (ед/г) рассчитывают по формуле

$$AK = \frac{A \times 1000}{t \times a}, \quad (6)$$

где A - оптическая плотность; 1000 - коэффициент пересчёта на 1 г препарата; a - количество ферментного препарата, взятое для анализа; t - продолжительность гидролиза субстрата, мин.

5.3. Липолитические ферменты

По международной классификации, фермент, катализирующий расщепление жиров или иных глицеридов с присоединением воды и образованием жирных кислот, называется гидролазой эфиров глицерина. Липаза - это его рабочее название. Липаза расщепляет жиры (триацилглицериды) на глицерин и жирные кислоты по следующей схеме:



Липазы относятся к гидролазам серинового типа. Семейство липазы содержит в качестве каталитически активной группировки триаду аминокислот Ser-His-Asp, осуществляющую перенос протона и каталитическую активацию воды по нуклеофильному механизму. То есть аминокислоты участвуют в элементарных актах активации молекул субстрата

в качестве кислот и оснований. Кроме того, в активный центр липаз входит глицин, аминокислота, формирующие геометрию активного центра.

Механизм катализа ферментами, содержащими аминокислоты Ser-His-Asp, включает ацилирование гидроксильной группы фермента с образованием интермедиата (ацилфермента) и его последующим гидролизом. Так как гидроксильная группа является слабым нуклеофилом, все ферменты этого типа имеют аминокислотные остатки, необходимые для её активации и депротонирования. Эти же остатки активируют молекулу воды на стадии дезацетилирования фермента.

По типу укладки полипептидной цепи липазы относят к белкам, построенным из нерегулярно чередующихся α - спиралей и β – листов (α,β - гидролазы). Строение липазы из *Candida rugosa* представлено на рис.2.

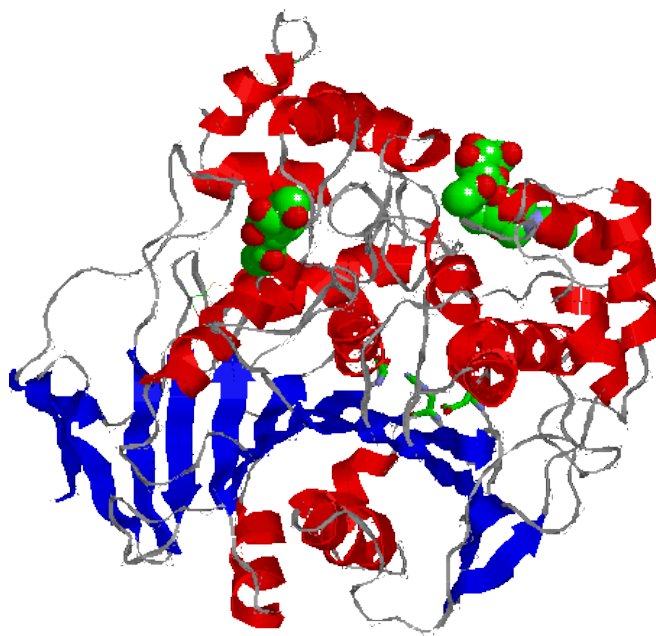


Рис.2. Строение липазы из *Candida rugosa*

Липолитические ферменты можно разделить на две группы: к первой группе относятся ферменты с широкой субстратной специфичностью, не нуждающиеся для проявления своего действия в каких-либо кофакторах; ко второй – металлоферменты со строгой узкой субстратной специфичностью.

Типичным представителем первой группы является липаза, второй – фосфолипаза.

Одна из отличительных особенностей гидролиза жиров липазой заключается в действии фермента на поверхности раздела гидролизуемый эфир-вода.

При этом фермент водорастворим, а субстрат, эмульгированный или диспергированный в воде, образует нерастворимую фазу. Для эмульгирования жиров применяют различные природные и синтетические эмульгаторы. При использовании в качестве субстратов эмульсий растительных масел липолитическая активность ферментов может значительно изменяться в зависимости от природы эмульгатора.

Липолитические препараты могут быть получены на основе трёх источников: животные ткани, семена некоторых растений и микроорганизмы. Источником животной липазы является поджелудочная железа. Она может находиться в комплексе с другими панкреатическими ферментами или в свободном состоянии. Липаза содержится в заметных количествах в семенах многих растений: ржи, пшеницы, сои, овса, хлопчатника и особенно клещевины, липаза которой нерастворима в воде.

Наиболее перспективным источником липаз являются микроорганизмы, это связано с тем, что животное и растительное сырье не может удовлетворить растущую потребность в этих ферментах. Липазы образуют микроорганизмы различных таксонометрических групп: актиномицеты, бактерии, микроскопические грибы и дрожжи.

Липазы, полученные из различных источников (животные ткани, семена некоторых растений, микроорганизмы), заметно отличаются друг от друга. Так, различия в активности липолитических ферментов даже у различных штаммов одного вида могут колебаться в десятки и сотни раз.

Липолитические ферменты, выделенные из различных источников, различаются по своей термостабильности. Известны липазы, стабильные при 20 и 65 °С, но большинство наибольшую стабильность имеет в диапазоне

температур от 30 до 40 °С. В зависимости от оптимального pH для действия липаз они делятся на кислые (4-6), нейтральные (6,5-7,2) и щелочные (7,5-9).

5.3.1. Определение активности фермента липазы

Для обнаружения липазы, как и для её определения, очень важно выбрать субстраты и условия реакции, обеспечивающие действие именно этого энзима. Так, при правильном подборе метода не будут определяться наряду с липазами и нелиполитические эстеразы.

Наиболее универсальным субстратом является глицеротриолеат (триолеин). Он отвечает всем требованиям, которые предъявляются к липазному субстрату, так как содержит только высшие жирные кислоты и при температурах, обычно применяемых для определения активности, находится в жидком состоянии. Оливковое масло, в котором содержание эфиров олеиновой кислоты превышает 70 %, служит хорошим и недорогим заменителем триолеина. Для удаления из масла свободных жирных кислот, моно- и диглицеридов используют фильтрацию через колонку, заполненную активированным углём, нейтральной окисью алюминия и другими сорбентами. Иногда исследователи в качестве субстратов для определения активности липаз используют другие жиры и масла: подсолнечное, рапсовое, молочный жир, говяжий жир и др.

Для выяснения механизма каталитического действия липолитических ферментов целесообразно использовать водорастворимые субстраты. Широко используют такие субстраты, как триацетин, трибутирин, трипропионин и другие. Чтобы сделать определение менее трудоёмким и повысить его чувствительность, некоторые исследователи используют хромогенные и радиоактивные субстраты.

Принцип метода. Проводят определение количества жирных кислот, образующихся при действии липазы на жир. Образующиеся кислоты оттитровывают гидроксидом натрия и рассчитывают активность липазы.

Необходимые реактивы: ацетатный буферный раствор, pH 4,7; 0,2 М боратный буферный раствор, pH 8,5; 0,1 н гидроксид натрия; подсолнечное масло; этиловый спирт, эфир, 1%-й раствор тимолфталейна в спирте.

Подготовка растительного масла: 300 г подсолнечного масла взбалтывают в делительной воронке с 2%-м раствором щёлочи, дают отстояться и сливают щелочной раствор. Масло промывают в воронке несколько раз водой до отрицательной реакции с фенолфталейном. Затем промытое масло отстаивают и сушат, пропуская через колонку с хлористым кальцием.

Приборы и принадлежности: бюретка для титрования, термостат, мешалка, ступка фарфоровая, конические колбы с притёртыми пробками на 100 мл, пипетки, пробирки.

Ход работы: 2 г ферментного препарата смешивают в двух ступках с 1 мл чистого подсолнечного масла в каждой ступке. Для определения активности кислых липаз в ступку приливают 5 мл ацетатного буфера pH 4,7, а для активности щелочных – 5 мл боратного буфера pH 8,5 и некоторое время растирают содержимое ступок. Растёртый препарат переносят в конические колбы с притёртыми пробками, остатки со ступки смывают в колбу 5 мл воды, добавляют по 5 капель толуола, закрывают пробками и тщательно перемешивают в мешалке. Колбы ставят в термостат при 30 °C на 20-24 ч. В качестве контрольных проб берут такие же две навески и обрабатывают их так же, как и опытные, но перед тем, как ставить в термостат, колбы кипятят 5-10 мин для инактивации фермента.

После инкубации в термостате во все колбы приливают по 50 мл этанольно-эфирную смесь (4:1) и взбалтывают. После отстаивания титруют 0,1 н спиртовым раствором NaOH, добавив несколько капель тимолфталейна.

Активность кислых и щелочных липаз выражают в мл 0,1 н NaOH, пошедших на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся в результате действия липаз, по формуле

$$X = \frac{a \times T - b \times T}{c}, \quad (7)$$

где X - активность липазы;

a - кол-во 0,1 н NaOH, пошедшего на титрование опытной пробы, мл;

b – количество 0,1 н NaOH, пошедшего на титрование контрольной пробы, мл;

T - поправка к титру 0,1 н NaOH;

c - масса ферментного препарата, г.

5.3.2. Определение активности липазы по модифицированному методу Ота-Ямада

За единицу ферментативной активности липазы принимают такое количество фермента, которое освобождает 1 мкмоль олеиновой кислоты из 40%-й эмульсии оливкового масла при pH 7,0 и t=37 °C в течение 1 ч.

Метод основан на определении путем титрования щелочью жирных кислот, образовавшихся под действием липазы при использовании в качестве субстрата оливкового масла.

Для проведения этого анализа необходимы *следующие реактивы*: раствор оливкового масла (субстрат); 2%-й раствор поливинилового спирта; 1 н раствор соляной кислоты; 0,05 н раствор щелочи, фосфатно-цитратный буфер с pH 7,0; 1%-й раствор фенолфталеина; 90%-й раствор спирта; 1%-й раствор фермента.

Приготовление субстрата. 100 см³ оливкового масла смешивают со 150 см³ 2%-го раствора поливинилового спирта в эмульсаторе. Полученную

эмульсию выдерживают на льду в течение 60 мин. Если расслаивания не наблюдается, субстрат пригоден к использованию.

Приготовление раствора поливинилового спирта. 20 г спирта помещают в мерную колбу на 1 дм³ и добавляют 800 см³ дистиллированной воды. Суспензию выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре, затем добавляют 0,5 см³ 1 н раствора соляной кислоты и непрерывно перемешивают при температуре 80–90 °С в течение 1 ч. Затем раствор охлаждают, доводят до pH 7,0 раствором щелочи, объем доводят до 1 дм³ дистиллированной водой и полученный раствор фильтруют.

Проведение опыта: 5 см³ эмульсии – субстрата и 4 см³ буфера с pH 7,0 помещают в колбу на 100 см³, которую закрывают пробкой. Смесь выдерживают на водяной бане при температуре 37 °С в течение 10 мин. Затем к смеси добавляют 1 см³ раствора фермента и хорошо перемешивают. Полученную смесь выдерживают при температуре 37 °С в течение 60 мин, после чего немедленно добавляют 30 см³ этанола для прекращения реакции. Раствор титруют 0,05 н раствором щелочи в присутствии 1%-го раствора фенолфталеина до появления окраски.

Контрольную пробу готовят следующим образом. К смеси субстрата и буфера с pH 7,0, выдержанной при температуре 37 °С добавляют 30 см³ этанола, затем 1 см³ ферментного раствора и смесь немедленно титруют.

Разность между результатами титрования контрольной и опытной проб соответствует количеству 0,05 н раствора щелочи, которое пошло на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся из оливкового масла под действием фермента.

Липазную активность фермента ЛС (в ед/г) определяют по формуле

$$\text{ЛС} = \frac{A \times T \times 50}{V}, \quad (8)$$

где ЛС – липазная активность фермента, ед/г;

A – разность между результатами титрования опытной и контрольной проб, см³;

T – титр щелочи, г/мл (0,001996 г/мл);

B – концентрация образца ферментного раствора, г/см³.

50 – коэффициент пересчёта в мкмоль жирных кислот.

Для оценки количества молекул фермента среди других белков данной ткани определяют удельную активность (Уд.Ак.) фермента.

6. Микрогетерогенные ферментативные реакционные среды

В настоящее время существует ряд систем, которые позволяют моделировать природную иммобилизацию ферментов и их микроокружение. К ним можно отнести макрогетерогенные двухфазные системы и микрогетерогенные реакционные среды.

Наиболее известными наноструктурированными жидкими системами являются растворы поверхностно-активных веществ (ПАВ). Их дифильные молекулы при повышении концентрации в растворах способны образовывать мицеллы (ассоциаты коллоидных размеров, которые по порядку величины соизмеримы с размерами белка), для которых характерна способность солюбилизовать различные компоненты. Спонтанное мицеллообразование происходит в различных органических растворителях (бензол, октан, хлороформ и т.д.). В качестве мицеллообразующего материала могут быть применены детергенты, используемые в биохимии: додецилсульфат натрия, алкилированные полиэтиленгликоли (бридж, твин, тритон) или природные фосфолипиды.

Существуют несколько типов мицелл: нормальные (существующие в воде при не очень большой концентрации органических добавок) и обращённые (в органических растворителях при умеренном содержании воды). В зависимости от содержания того или иного компонента в системе ПАВ - органический растворитель-вода, помимо мицелл, образуются также и

более крупные ассоциаты и сложные (жидкокристаллические) структуры, такие как цилиндрическая (в том числе с гексагональной упаковкой), ламеллярная (слоистая) и другие (рис.3).

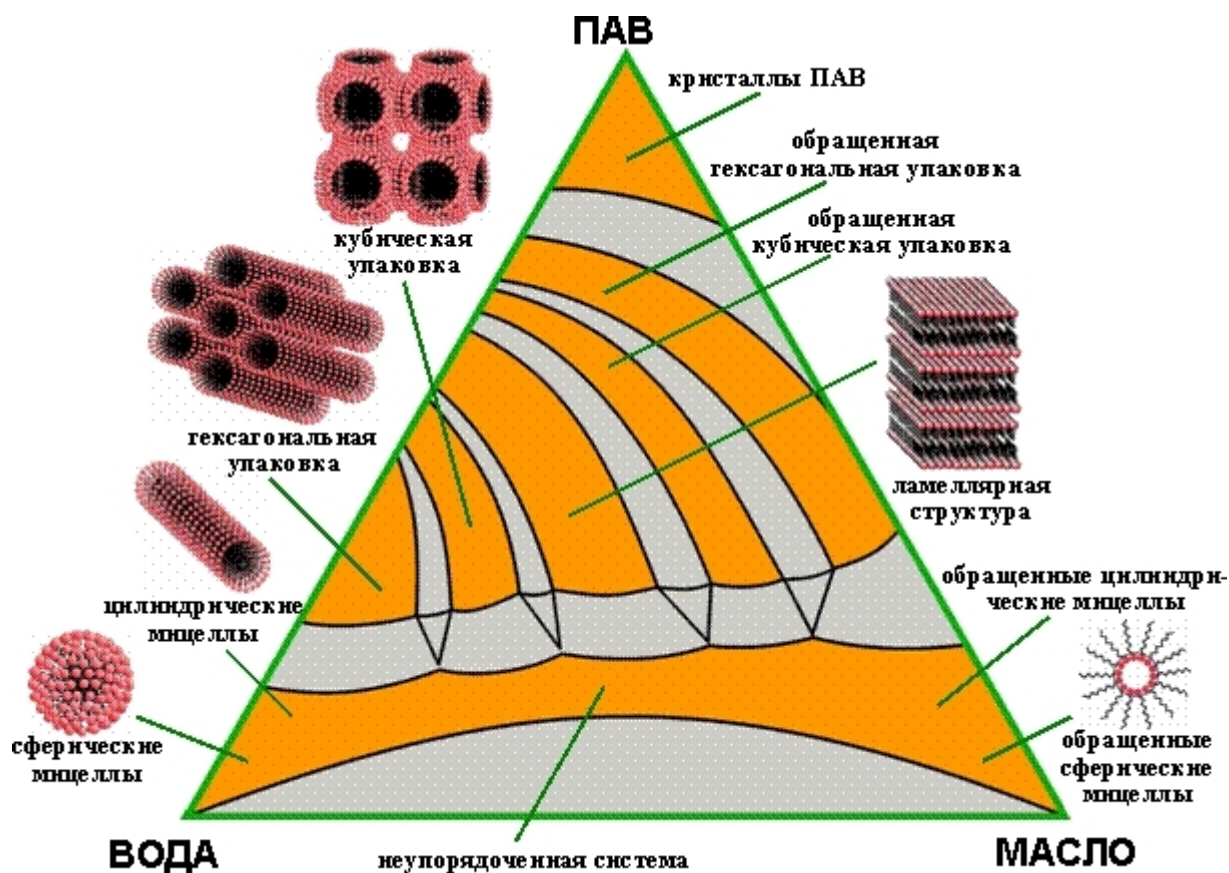


Рис.3. Мицеллярные системы

Обращённые мицеллы являются динамическими образованиями, которые с высокой скоростью обмениваются молекулами ПАВ между собой и раствором. Кроме того, молекулы ПАВ в растворе совершают быстрые колебания. Несмотря на высокую подвижность молекул ПАВ в растворе, поверхность раздела в мицеллах достаточно чётко выражена и непроницаема для органического растворителя. Благодаря своему динамическому характеру системы обращённых мицелл легко достигают равновесного состояния и могут длительно храниться без изменения свойств.

Обращённые мицеллы ПАВ в органических растворителях способны сольбилизовать значительные количества воды и других полярных

веществ. При солюбилизации воды образуются гидратированные обращённые мицеллы. В отличие от мицелл в безводных системах, они имеют сферическую форму и более крупные размеры (рис.4).

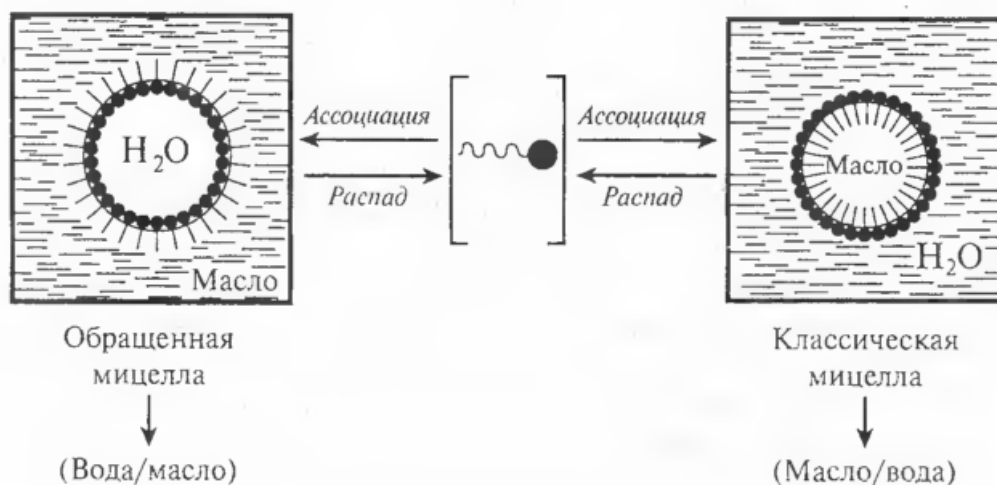


Рис.4. Классические и обращённые мицеллы

Скорость химических реакций с участием воды, как правило, резко возрастает при переходе от водного раствора к системам обращённых мицелл.

Приготовить ферментный раствор в коллоидной системе вода-органический растворитель достаточно просто. Включение фермента происходит самопроизвольно при простом встряхивании смеси водного раствора фермента и раствора ПАВ в органическом растворителе или при растворении сухого фермента в предварительно гидратированных обращённых мицеллах. В результате солюбилизации образуется оптически прозрачный раствор ферментсодержащих обращённых мицелл. В таких мицеллах молекула фермента локализована во внутренней водной полости и таким образом защищена от денатурирующего влияния органического растворителя слоем воды и (или) молекулами ПАВ. Общее содержание воды может составлять менее 1 %.

В настоящее время изучено поведение нескольких десятков ферментов различных классов в системах гидратированных обращённых мицелл. Все они сохраняют каталитическую активность в таких системах. Более того, для некоторых ферментов было обнаружено, что включение в обращённые мицеллы приводит к резкому увеличению их каталитической активности по сравнению с активностью в водном растворе. Стабильность ферментов в обращённых мицеллах зависит от содержания воды в системе и природы ПАВ. Варьируя эти параметры, можно найти такие условия, при которых стабильность фермента в мицеллах не только будет такая же, как и в водной среде, но и превосходить её.

Важным свойством мицеллярных систем является то, что молекула фермента, включившись внутрь мицеллы, может сама выбрать оптимальное для себя микроокружение. Например, молекула гидрофильного фермента локализуется в центре водной полости, оставаясь полностью в водном окружении, а молекула гидрофобного фермента способна контактировать с гидрофобной частью мембраны и даже с растворителем.

6.1. Влияние эмульгаторов на активность липазы

Целью работы является изучение влияния эмульгаторов природного и синтетического происхождения на активность липазы.

Необходимые реактивы: оливковое масло; 2%-й раствор поливинилового спирта; 2%-й раствор твина 20 (полиоксиэтиленсорбитана); 2%-й раствор яичного альбумина; 3%-й раствор желатина; 1 н раствора HCl; 0,05 н раствора NaOH; фосфатно-цитратный буфер с pH 7,0; 1%-й раствор фенолфталеина; 90%-й раствор спирта; 1%-й раствор фермента.

Приборы и посуда: колбы плоскодонные; гомогенизатор; пипетки на 1, 5, 10 мл; мерные цилиндры, бюретка; лёд; термостат.

Одной из отличительных особенностей гидролиза жиров липазой является действие фермента на поверхности раздела фаз гидролизуемый эфир-вода. При этом фермент водорастворим, а субстрат, эмульгированный или диспергированный в воде, образует нерастворимую фазу. Для эмульгирования жиров применяют различные природные и синтетические эмульгаторы. При использовании в качестве субстратов эмульсий растительных масел показано, что липолитическая активность может в значительной степени меняться в зависимости от природы эмульгатора.

Ход работы:

Приготовление эмульсий. В качестве эмульгаторов используют:

- 0,25%-й раствор твина 20;
- 2%-й раствор яичного альбумина;
- 3%-й раствор желатина;
- 2%-й раствор поливинилового спирта (в качестве контроля).

Для приготовления субстрата 100 см³ оливкового масла смешивают со 150 см³ раствора соответствующего эмульгатора в гомогенизаторе в течение 5-10 мин. Полученные эмульсии выдерживают на льду в течение 60 мин. Если наблюдается расслаивание, то следует повторить перемешивание.

Затем из полученных эмульсий отбирают по 10 см³ и используют отобранный субстрат для определения активности липазы по модифицированному методу Ота-Ямада (см. выше).

Оставшуюся часть эмульсий используют для определения их устойчивости. Для этого 50 см³ соответствующей эмульсии помещают в мерный цилиндр и оставляют на льду в течение еще 60 мин. Отмечают время начала расслаивания каждой эмульсии.

По полученным экспериментальным данным определить, при использовании какого эмульгатора скорость гидролиза максимальна и как зависит активность липазы от устойчивости эмульсии.

6.2. Гидролиз оливкового масла панкреатической липазой, включенной в обращённые мицеллы

Целью работы является изучение процесса гидролиза оливкового масла панкреатической липазой, включенной в обращённые мицеллы ПАВ.

Многие ферменты сохраняют ферментативную активность при включении их в обращённые мицеллы поверхностно-активных веществ в органических растворителях. Наличие в системе органической фазы даёт уникальную возможность изучать взаимодействие ферментов с соединениями, которые растворяются только в органической среде (субстратами, кофакторами, модификаторами ферментативной активности и др.).

Используя обращённые мицеллы с органической фазой, в которой растворён субстрат, исследователь получает возможность избежать стадии эмульгирования субстрата, применяемой при работе с липолитическими ферментами в водной среде.

В результате становится возможным более строго подойти в анализу субстратной специфичности фермента и оценке кинетических параметров.

Необходимые реактивы: раствор детергента (твин, бридж, тритон) в органическом растворителе (гексан, петролейный эфир) 0,05 М/л; 1%-й раствор панкреатической липазы в буферном растворе (трис-НСI-буфер рН=8,0); оливковое масло; 0,02 N раствор NaOH в 80%-м этиловом спирте; 1%-й раствор фенолфталеина в 80%-м этиловом спирте.

Посуда и приборы: пробирки с завинчивающимися крышками или бюксы с притёртыми крышками; пипетки объёмом 1, 2, 5 мл; мерные цилиндры; бюретка для титрования; термостат на 25 °С; термометр.

Ход работы. Для приготовления раствора субстрата готовят 0,1 М/л раствора оливкового масла, используя в качестве растворителя гексан или петролейный эфир (возможно также использование в качестве растворителя

пентана, гептана или октана), который содержит ПАВ в концентрации 0,05 М/л.

Для включения фермента в обращённые мицеллы в ряд пробирок помещают по 1 мл раствора субстрата, в каждую добавляют по 10 мкл 1%-го раствора фермента в трис-НСl-буфере (рН 8,0, концентрация буфера 0,1 М/л). Смесь интенсивно встряхивают и выдерживают в течение 60 мин при температуре 37 °С. Отбор проб осуществляют каждые 15 мин. Для этого часть пробирок вынимают из термостата и охлаждают до температуры 20 °С, содержимое пробирок тщательно перемешивают и определяют количество выделившейся кислоты титриметрическим методом. Образовавшуюся в ходе реакции олеиновую кислоту оттитровывают спиртовым раствором NaOH (0,02 н раствора в 80%-м этиловом спирте) с фенолфталеином до устойчивой (не исчезающей в течение 1 мин) розовой окраски.

Контроль не содержит фермента, его добавляют непосредственно перед титрованием.

Выход жирных кислот определяют следующим образом:

$$B = \frac{20 \times K \times q}{C}, \quad (9)$$

где B - выход жирных кислот, мкмоль/мг; K -коэффициент титрования; q - количество раствора щёлочи, пошедшее на титрование ЖК, выделившихся в процессе реакции за время t (мин); 20 - коэффициент пересчёта в мкмоли жирных кислот, найдённый расчётным путём; C - количество фермента, мг.

$$q = A - B, \quad (10)$$

где A -количество раствора щёлочи, пошедшее на титрование опытной пробы, мл; B -количество раствора щёлочи, пошедшее на титрование контрольной пробы, мл.

Липолитическую активность рассчитывают по следующей формуле:

$$V = \frac{20 \times K \times q}{C \times t}, \quad (11)$$

где V - липолитическая активность, мкмоль/(мг·единица времени);

K - коэффициент титрования; q -количество раствора щёлочи, пошедшее на титрование ЖК, выделившихся в процессе реакции за время t (мин); 20 - коэффициент пересчёта в мкмоли жирных кислот, найдённый расчётным путём; C -количество фермента, мг.

Библиографический список

Практикум по биохимии: учеб. пособие/под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьёвой.—2-е изд., перераб. и доп. — М.: Изд-во МГУ, 1989. —509 с.

Лабораторные работы по энзимологии / сост. Н.Г. Луценко. — М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2006. – 64 с.

Гамаюрова В.С. Ферменты. Лабораторный практикум : учеб. пособие / В.С. Гамаюрова, М.Е. Зиновьева. — СПб. : Проспект Науки, 2011. – 256 с.

Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: учебник / под ред. С.С. Дебова. — М.: Медицина, 1983 - 752 с.

Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. В 3 т./ пер.англ.- М.: Мир, 1982.

Биологическая химия с упражнениями и задачами: учебник / под ред. чл.-корр. РАМН С.Е. Северина. - 2011. - 624 с.

Ленинджер А. Основы биохимии. В 3 т. / пер. с англ.-М.: Мир, 1985. Т. 1.-367 с.

<http://ppmand.ru/ppm/cook/ferment.htm>