

УДК 577.152.3-026.5:664.29:633.31

ТЕРМООПТИМУМ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ПЕКТИНМЕТИЛЭСТЕРАЗЫ И ПОЛИГАЛАКТУРОНАЗЫ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ИЗ ЛЮЦЕРНЫ

А. Т. БЕЗУСОВ, Т. И. НИКИТЧИНА*

Кафедра биотехнологии, консервированных продуктов и напитков, Одесская национальная академия пищевых технологий, Одесса, УКРАИНА

*email: alex-n@te.net.ua

АННОТАЦИЯ Досліджений вплив температури на швидкість ферментативних реакцій при дії пектинметилестерази і полігалактуранази ферментного препарату люцерни. Методом потенціометра визначили вплив температури на стабільність ферменту, швидкість розпаду фермент-субстратного комплексу і спорідненість ферменту до субстрату. Отримані дані свідчать про стабільність ферментів, виділених з люцерни. Цей показник перевищує дані препарату мікробіологічного походження "Пектофостидин P20x", що дозволяє проводити ферментативну реакцію при високих температурах, підвищуючи технологічні властивості рослинного ферменту.

Ключові слова: ферменти, пектинметилестераза, полігалактураназа, люцерна, температура, пектин.

АННОТАЦИЯ Исследовано влияние температуры на скорость ферментативных реакций при воздействии пектинметилэстеразы и полигалактураназы ферментного препарата люцерны. Потенциометрическим методом определили влияние температуры на стабильность фермента, скорость распада фермент-субстратного комплекса и сродство фермента к субстрату. Полученные данные свидетельствуют о стабильности ферментов, выделенных из люцерны. Этот показатель превышает данные препарата микробиологического происхождения «Пектофостидин P20x», что позволяет проводить ферментативную реакцию при высоких температурах, повышая технологические свойства растительного фермента.

Ключевые слова: ферменты, пектинметилэстераза, полигалактураназа, люцерна, температура, пектин.

TEMPOPTIMUM AND THERMOSTABILITY OF PECTIN METHYLESTERASE AND POLYGALACTURONASE OF ENZYMATIC PREPARATIONS FROM ALFALFA

A. BEZUSOV¹, T. NIKITCHINA^{2*}

Department of Biotechnology, canned foods and beverages, Odesa national academy of food technologies, Odesa, UKRAINE

ABSTRACT Most necessary for industry along with amylolytic and proteolytic enzymes there are enzymes of pectolytic complex. In modern technologies of food productions enzymes preparations with pectolytic activity found application in the technological operations of lighting up of juices (apple, vine, pear), and also at the production of juices with pulp (citrus, plum, tomato), that does them irreplaceable at processing of berries, fruit, vegetables. In basis of their use in technologies ability of deesterification lies and to depolymerize a pectin (pectinase and pectate accordingly). The use of the enzymes preparations with pectolytic activity, got by a microbiological synthesis, is wide in modern technologies. Source of such preparations are genetically modified mycelia mushrooms. Practically all products of microbial biotechnology can contain undesirable elements are by-products of vital functions of microorganisms, and require an obligatory certification and examination. Research of alternative pectolytic enzymes of grassy culture is alfalfas, allows to get clean preparations ecologically. Experiments showed that influence of temperature on stability of enzyme, speed of disintegration of enzyme-substance complex and affinity of enzyme to substance exceed data of preparation of microbiological origin of "Pectofoetid P20x", that allows to conduct a enzymes reaction at high temperatures, promoting technological properties of vegetable enzyme. The conducted analysis allowed estimating as far as sharply a necessity costs for the industrial receipt of enzymes preparations of phytogenous.

Keywords: enzymes, pectin methylesterase, polygalacturonase, alfalfa, temperature, pectin.

Введение

Растительное сырьё является богатым источником не только биологически активных веществ, но и ферментов, которые не загрязнены токсичными продуктами метаболизма бактерий и микроорганизмов, и, таким образом, выгодно отличаются от ферментных препаратов микробиологического происхождения, которые

широко используются отечественной промышленностью.

Известно, что разработка нового ассортимента пищевых продуктов с содержанием пектина, особенно низкометоксилированного, имеет большое значение в лечебно-профилактических рационах питания для регуляции обмена холестерина, как антидотов и радиопротекторов. Получение низкометоксилированного пектина возможно с помощью биотехнологических методов, в том числе обработки

пектиновых веществ или пектинсодержащего сырья пектинметилэстеразой.

Растительные пектинметилэстеразы содержатся в таком традиционном для Украины сырье как томаты, морковь, свекла, яблоки, айва, баклажаны, кабачки, сладкий перец, стручки гороха, арбузные корки, лук, тыква, чеснок, листья табака, фасоль. Перечисленное сырьё является стратегически важным, так как используется для производства пищевых продуктов. Оптимальным решением использования традиционного сырья является использование отходов и некондиционного сырья, или переработка нетрадиционного листового и травяного сырья – люцерны, сирени, маиса, ириса, клевера, подорожника, репы, другое [1–3].

Ферментный препарат с высокой пектинметилэстеразной активностью, полученный нами из люцерны, можно применять для производства различных пищевых продуктов, в первую очередь, в технологических соковых производствах. Для успешного применения препарата необходимо знать, при каких условиях проявляемая им активность максимальна и какие факторы влияют на ферменты данного препарата. Принципиальное значение для ферментов имеют субстрат и его концентрация, pH среды взаимодействия, а также её температура.

Цель работы

Целью работы стало исследование влияния температуры на скорость ферментативных реакций, стабильность ферментного препарата люцерны и кинетику деэтерификации пектиновых веществ.

Изложение основного материала

Особенностью ферментов является проявление активности только в определённом интервале температур, причём в ряде случаев для действия определённого фермента существует только определённый температурный оптимум. Для изучения поставленной цели необходимо выполнить следующее: установить истинное обратимое влияние температуры на скорость реакции (в условиях насыщения субстратом); определить влияние температуры на сродство фермента к субстрату; исследовать влияние температуры на стабильность фермента, который может необратимо инактивироваться при значениях, отличающихся от оптимального.

Данные сведения имеют большое практическое значение для применения разработанного ферментного препарата люцерны для пищевой промышленности при производстве пектино-содержащих продуктов функциональной направленности.

Известно, что ферменты, как класс биологических молекул, обладают очень низкой стабильностью. Стандартная свободная энергия

нативной конформации фермента в обычных условиях, как правило, лишь на 20...60 кДж/моль меньше свободной энергии денатурированной формы. Поэтому даже небольшие отклонения внешних условий от тех, которые характерны для микроокружения ферментов в клетке, могут оказаться достаточными, чтобы нарушить структуру и функцию ферментов, то есть инактивировать их [4, 5].

При проведении ферментативной реакции особенно важно влияние температуры: с одной стороны – увеличение начальной скорости, с другой – денатурация фермента под действием температуры, обуславливающая непрерывное уменьшение концентрации активного фермента. Оптимальная температура зависит от соотношения между влиянием температуры на скорость ферментативной реакции и её влиянием на скорость деструкции фермента [6]. Учитывая эти теоретические аспекты, рассматривали термическую стабильность пектинметилэстеразы и полигалактуроназы ферментного препарата люцерны.

Обсуждение результатов

Для количественной оценки термической стабильности ферментного препарата из люцерны используются различные величины: константа скорости мономолекулярной инактивации фермента, либо константы скорости на глубине инактивации 50 или 75 %, полупериод жизни фермента, доля остаточной активности фермента после его инкубации в течение фиксированного времени при определённой температуре [7, 8, 9]. Стабильность ферментов оценивали сравнительно со стабильностью пектинметилэстеразы и полигалактуроназы в препарате «Пектофоеитидин П20х» (рис. 1, рис. 2).

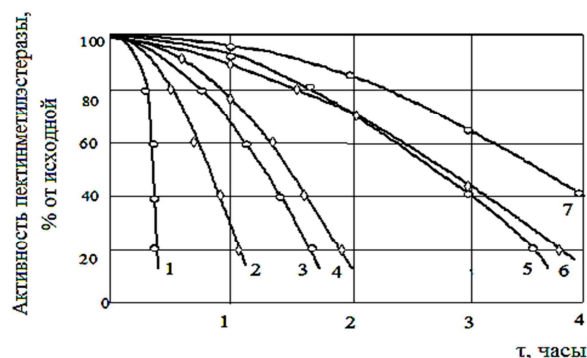


Рис. 1 – Зависимость активности пектинметилэстеразы ферментного препарата люцерны (ФПЛ) и препарата «Пектофоеитидин П20х» от времени и температуры: 1 – ФПЛ при $t=80\text{ }^{\circ}\text{C}$; 2 – препарат «Пектофоеитидин П20х» при $t=65\text{ }^{\circ}\text{C}$; 3 – ФПЛ при $t=65\text{ }^{\circ}\text{C}$; 4 – препарат «Пектофоеитидин П20х» при $t=50\text{ }^{\circ}\text{C}$; 5 – ФПЛ при $t=50\text{ }^{\circ}\text{C}$; 6 – препарат «Пектофоеитидин П20х» при $t=32\text{ }^{\circ}\text{C}$; 7 – ФПЛ при $t=32\text{ }^{\circ}\text{C}$

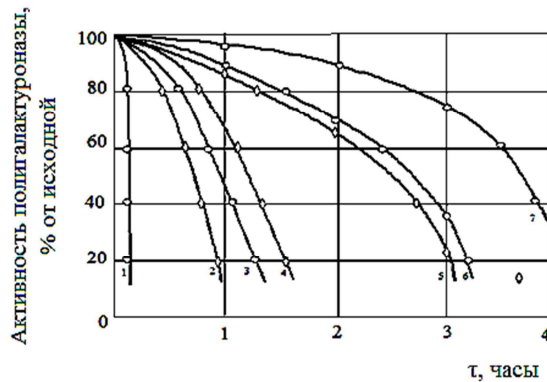


Рис. 2 – Зависимость активности полигалактуроназы ферментного препарата люцерны (ФПЛ) и препарата «Пектофоетидин П20х» от времени и температуры: 1 – ФПЛ при $t=80\text{ }^{\circ}\text{C}$; 2 – препарат «Пектофоетидин П20х» при $t=65\text{ }^{\circ}\text{C}$; 3 – ФПЛ при $t=65\text{ }^{\circ}\text{C}$; 4 – препарат «Пектофоетидин П20х» при $t=50\text{ }^{\circ}\text{C}$; 5 – препарат «Пектофоетидин П20х» при $t=32\text{ }^{\circ}\text{C}$; 6 – ФПЛ при $t=50\text{ }^{\circ}\text{C}$; 7 – ФПЛ при $t=32\text{ }^{\circ}\text{C}$

Параллельно изучали зависимость активностей пектинметилэстеразы и полигалактуроназы ферментного препарата люцерны от температуры (рис. 3).

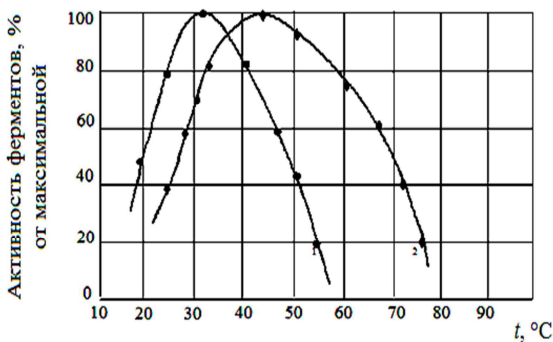


Рис. 3 – Зависимость активности пектинметилэстеразы (1) и полигалактуроназы (2) от температуры в ферментном препарате люцерны

Полученные данные свидетельствуют о том, что стабильность обоих ферментов, выделенных из люцерны, превышает этот показатель препарата микробиологического происхождения «Пектофоетидин П20х», что позволяет проводить ферментативную реакцию при более высоких температурах, а значит и с большей эффективностью.

По результатам кинетических исследований определяли оптимальные условия проведения процесса, судя о степени сродства субстратов и ингибиторов, чтобы дать характеристику природы ферментативного процесса [10]. Участие в

механизмах ферментативных реакций промежуточных соединений:



где E – пектинметилэстераза или полигалактуроназа люцерны, выполняющий функцию катализатора химической реакции; S – яблочный или цитрусовый пектин; K_M и $K_{кат}$ – константы Михаэлиса и каталитической диссоциации химической реакции; ES – фермент-субстратный комплекс; P – продукт химической реакции.

Данный механизм приводит к следующей зависимости стационарной скорости реакции от концентрации яблочного или цитрусового пектина (уравнение Михаэлиса):

$$\vartheta = \frac{d[S]}{d\tau} = -d[S] = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}, \quad (2)$$

где ϑ – скорость химической реакции, кмоль/ $\text{м}^3 \cdot \text{мин}$; [S] – концентрация субстрата; τ – время химической реакции, мин; V_{max} – это кинетическая константа, с помощью которой можно характеризовать эффективность работы фермента, физический смысл которой – предел, к которому стремится скорость реакции при бесконечном повышении концентрации субстрата.

Физический смысл K_M заключается в том, что она представляет собой константу равновесия между двумя реакциями, приводящими к распаду фермент-субстратного комплекса и той реакцией, которая ведет к образованию этого комплекса.

С помощью K_M можно характеризовать сродство данного фермента к данному субстрату. Чем меньше K_M , тем больше сродство фермента к данному субстрату, а значит тем больше равновесие первого этапа ферментативной реакции сдвинуто вправо – в сторону образования фермент-субстратного комплекса. Значит, будут созданы наилучшие условия для протекания и второго этапа ферментативного процесса. При таких условиях для достижения эффективного превращения субстрата требуется малая концентрация субстрата. Значит, и V_{max} теоретически может быть достигнута при малых количествах субстрата. Если K_M высока, то это означает, что сродство фермента к такому субстрату низкое и реакция при небольших концентрациях субстрата протекает неэффективно.

Параметры V_{max} и K_M в большинстве случаев имеют эффективное значение, поскольку включают константы скоростей элементарных химических актов многостадийного ферментативного процесса.

На основании предварительного изучения зависимостей активности пектинметилэстеразы от концентрации ферментного препарата (линейную зависимость наблюдали до значения активности фермента $15,5 \text{ Ед/см}^3$), pH и температуры среды,

изучали скорости демеоксилирования цитрусового и яблочного пектинов; сравнивали их со скоростями реакций деэтерификации, катализируемых промышленным ферментным препаратом «Пектофоедин П20х». Показано (рис. 4), что выделенный препарат деэтерифицирует и цитрусовый, и яблочный пектин значительно активнее, чем «Пектофоедин П20х».

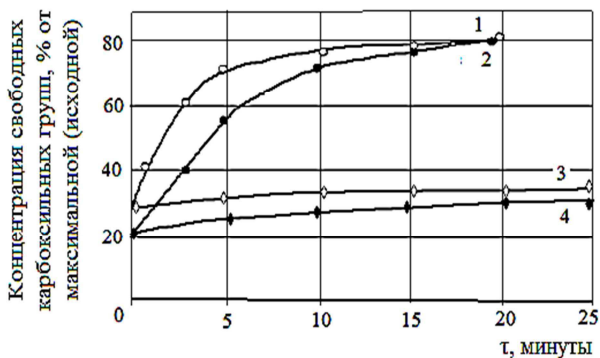


Рис. 4 – Динамика демеоксилирования различных пектинов под действием ферментов: 1 – яблочный пектин и пектинметилэстераза «Пектофоедин П20х»; 2 – цитрусовый пектин и пектинметилэстераза «Пектофоедин П20х»; 3 – яблочный пектин и пектинметилэстераза ФПЛ; 4 – цитрусовый пектин и пектинметилэстераза ФПЛ

При этом максимальная степень демеоксилирования составила 80,0 %. Изучение влияния начальной степени этерификации на скорость ферментативного демеоксилирования (рис. 5) позволяет интерпретировать данные, представленные на рис. 4 как зависящие от природы пектина и от начальной степени этерификации, чем, и обусловлено различие в виде кривых 1 и 2 на рис. 4.

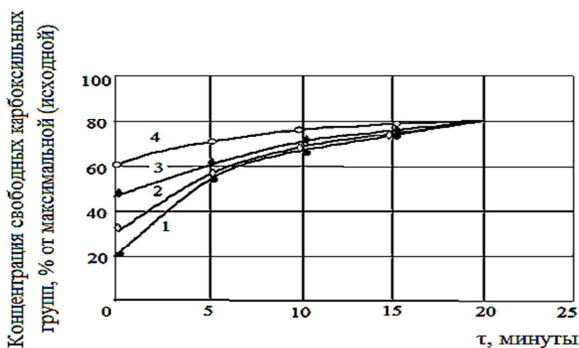


Рис. 5 – Динамика демеоксилирования яблочного пектина под действием пектинметилэстеразы ферментного препарата люцерны от начальной степени этерификации: 1- начальная степень этерификации пектина 80 %; 2 - начальная степень

этерификации пектина 68 %; 3 - начальная степень этерификации пектина 54 %; 4 - начальная степень этерификации пектина 40 %

Изучение данных кинетики демеоксилирования цитрусового и яблочного пектинов ферментным препаратом люцерны (рис. 6), преобразованных в координатах Лайнуивера-Берка, позволило определить для пектинметилэстеразы ферментного препарата люцерны $K_M = 4,5 \times 10^{-4}$ моль/дм³ и $V_{max} = 2,28 \times 10^{-6}$ моль/с по яблочному пектину; $K_M = 1,74 \times 10^{-4}$ моль/дм³ и $V_{max} = 2,27 \times 10^{-6}$ моль/с по цитрусовому пектину. Эти значения лежат в пределах соответствующих значений для пектинметилэстеразы микробиологического происхождения.



Рис. 6 – Зависимость скорости реакции деэтерификации яблочного пектина под действием пектинметилэстеразы ферментного препарата люцерны от начальной степени этерификации: 1- начальная степень этерификации пектина 80 %; 2 - начальная степень этерификации пектина 68 %; 3 - начальная степень этерификации пектина 40 %.

Как следует из полученных результатов, пектинметилэстераза ферментного препарата люцерны обладает большим сродством к яблочному пектину, чем к цитрусовому, при практически одинаковых максимальных скоростях распада интермедиата на продукты реакции. Различие констант Михаэлиса для пектинов означает, что для достижения данной скорости реакции деэтерификации яблочного пектина требуется большая концентрация субстрата. Анализируя полученные данные о меньшем сродстве пектинметилэстеразы ферментного препарата люцерны к цитрусовому пектину и данные о предельной степени деэтерификации 80,1 % при всех изученных начальных значениях степени этерификации, можно предположить, что этот предел (80,1 %), дальше которого ферментативная реакция прекращается, обусловлен именно снижением родства деэтерифицированной формы к пектинметилэстеразе. Эффект может быть обусловлен возросшим статическим зарядом молекулы пектина и её пространственной конформацией.

Выводы

Определены температурный оптимум и термостабильность пектинметилэстеразы ферментного препарата люцерны. Установлено, что максимальная активность пектинметилэстеразы наблюдается при температуре 32 °С, что выше активности пектинметилэстеразы микробного происхождения в используемых промышленных препаратах. Данный факт можно использовать для повышения температур реакционных смесей и увеличения скорости реакций модификации пектиновых веществ.

Изучена кинетика деметоксилирования цитрусового и яблочного пектинов ферментным препаратом люцерны.

Установлено, что для пектинметилэстеразы ферментного препарата люцерны $K_M = 4,5 \times 10^{-4}$ моль/дм³ и $V_{max} = 2,28 \times 10^{-6}$ моль/с по яблочному пектину и $K_M = 1,74 \times 10^{-4}$ моль/дм³ и $V_{max} = 2,27 \times 10^{-6}$ моль/с по цитрусовому пектину. Таким образом, пектинметилэстеразы ферментного препарата люцерны обладает большим сродством к яблочному пектину, чем к цитрусовому, при равных скоростях распада интермедиата на продукты реакции. Получение и использование ферментного препарата люцерны позволяет повысить рентабельность пектиносодержащего сырья и получить целый ряд функциональных продуктов, и таким образом решить проблему импортозамещения в отечественной пищевой промышленности.

Список литературы

1. **Atwell, W. A.** Starches / **W. A. Atwell, D. J. Thomas** // *J. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.* – 1997. – P. 25-30.
2. **Galliard, T.** Starch; Properties and Potential / **T. Galliard** // Society of Chemical Industry. Chichester, UK: John Wiley and Sons. – 1987. – P. 40-68.
3. **Whistler, R. L.** Starch Chemistry and Technology [Text]: 2nd ed. / **R. L. Whistler, J. N. Miller, E. F. Paschall, F. L. Orlando** // Academic Press. – 1984. – P. 135-324.
4. **Kravtchenko, T. P.** Analytical comparison of three industrial pectin preparations / **T. P. Kravtchenko, A. O. J. Voragen, W. Pilnik** // *Carbohydr. Polym.* – 1992. – Vol. 18. – 1824 p.

5. **Thom, D. G.** Interaction associations of alginate and pectins / **D. G. Thom, Y. S. M. Dec, E. K. Morris et al** // *Progr. Food Nutr. Sci.* – 1982. – Vol. 6. – P. 97-108.
6. **Kim, W. J.** Effect of chemical composition on compressive mechanical properties of lowester pectin gels / **W. J. Kim, V. N. M. Rao and Smit** // *Journal Food Science.* – 1998. – vol. 43. – №2. – P. 572-575
7. **Bender, M. L.** The Bioorganic Chemistry of Enzymatic Catalysis / **M. L. Bender** // Society of Chemical Industry. Chichester, UK: John Wiley and Sons. – 1984. – P. 143-178.
8. **Варфоломеев, С. Д.** Кинетические методы в биохимических исследованиях / **С. Д. Варфоломеев, С. В. Зайцев.** – М.: МГУ. – 1982. – 342 с.
9. **Даниляк, Н. И.** Ферментные системы / **Н. И. Даниляк, В. Д. Семачевский, Л. З. Дудученко, И. А. Трутнева.** – Киев: Наукова думка. – 1989. – 279 с.
10. **Березин, И. В.** Практический курс химической и ферментативной кинетики / **И. В. Березин, А. А. Киселёв.** – М.: МГУ. – 1976. – 320 с.

Bibliography (transliterated)

1. **Atwell, W. A., Thomas, D. J.** Starches. *J. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists*, 1997, 25-30.
2. **Galliard, T.** Starch; Properties and Potential. *Society of Chemical Industry*. Chichester, UK: John Wiley and Sons, 1987, 40-68.
3. **Whistler, R. L., Miller, J. N., Paschall, E. F., Orlando, F. L.** Starch Chemistry and Technology. *Academic Press*, 1984, 135-324.
4. **Kravtchenko, T. P., Voragen A. O. J., Pilnik W.** Analytical comparison of three industrial pectin preparations: *Carbohydr. Polym*, 1992, **18**, 1824 p.
5. **Thom, D. G.** Interaction associations of alginate and pectins. *Progr. Food Nutr. Sci.*, 1982, **6**, 97-108.
6. **Kim W. J., Rao V. N. M. and Smit.** Effect of chemical composition on compressive mechanical properties of lowester pectin gels. *Journal Food Science*, 1998. **2(43)**, 572-575
7. **Bender, M. L.** The Bioorganic Chemistry of Enzymatic Catalysis : *John Wiley and Sons*, 1984, 143-178.
8. **Varfolomeev S. D., Zajcev S. V.** Kinetic methods are in biochemical researches. Moscow: MGU, 1982, 342 p.
9. **Daniljak N. I., Semachevskij V. D., Duduchenko L. Z., Trutneva I. A.** Fermentnye sistemy. Kiev: Naukova dumka, 1989, 279 p.
10. **Berezin I. V., Kiseljov A. A.** Practical course of chemical and enzymes kinetics. Moscow: MGU, 1976, 320 p.

Надійшла (received) 15.10.2015