

3. Сульфитная и бисульфитная целлюлоза из древесины топняка белится без затруднений при сохранении высоких прочностных показателей.

Поступила 9 ноября 1993 г.

УДК 581.116

И. Я. КИСЕЛЕВ

С.-Петербургская лесотехническая академия

МЕХАНИЗМ ФОРМАЛЬДЕГИДНОЙ ДЕНАТУРАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

Показано, что даже незначительное содержание в растворе формальдегида снижает активность фермента каталазы, что связано с денатурацией белка-фермента по механизму, установленному с помощью ИК-спектроскопии.

It has been shown that even slight formaldehyde content of the solution reduces the catalase activity that is related to protein-ferment denaturation by IR-spectroscopy mechanism.

В живой клетке имеется свыше двух тысяч специфических ферментов [1, 2, 5].

Повышенная температура, органические растворители и др. вызывают разрыв химических связей в молекуле белка-фермента. Происходит денатурация, т. е. изменение его структуры, и потеря им каталитической активности [3—6]. Известно, что формальдегид CH_2O свертывает белки, делая их более твердыми [7].

Цель данной работы — изучить механизм формальдегидной денатурации ферментов зеленых листьев древесных растений.

Для эксперимента брали 250 мг мелконарезанного зеленого листа клёна остролистного влажностью 75...80%. Навеску помещали в стаканчик вместимостью 50 мл и наливали 25 мл водного раствора CH_2O (для контрольного опыта прибавляли 25 мл дистиллированной воды). Экстракцию ферментов производили при комнатной температуре и одинаковой интенсивности перемешивания раствора мешалкой в течение 1 ч. При этом водорастворимые ферменты переходят в раствор и реагируют с формальдегидом.

Экстракт отделяли на сечтатом фильтре. Затем изучали каталитическую активность содержащихся в экстракте ферментов. Экстракт помещали в колбу газовойолунометрической установки и прибавляли к нему 20 мл 15%-го водного раствора пероксида водорода H_2O_2 [3]. Продолжительность опыта при постоянном перемешивании раствора

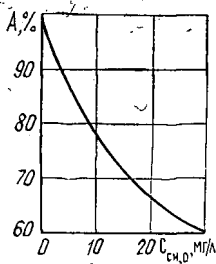


Рис. 1. Зависимость активности A фермента каталазы зеленых листьев клёна остролистного от массовой доли формальдегида $C_{\text{CH}_2\text{O}}$ в растворе

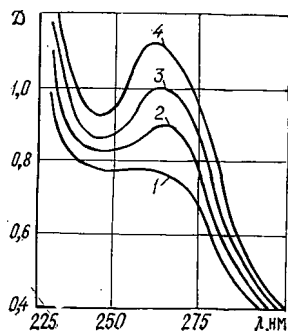
15 мин. Реакция разложения H_2O_2 на молекулярный кислород и воду катализируется ферментом каталазой. Каталитическую активность фермента оценивали объемом выделившегося кислорода, приведенного к нормальным условиям.

Активность фермента, содержащегося в контрольном экстракте, принята за 100 %.

На рис. 1 представлена зависимость активности A фермента каталазы от содержания формальдегида в растворе. Как видно из рис. 1, даже незначительное количество формальдегида (5 мг/л) понижает активность каталазы примерно на 15 %. Увеличение формальдегида в растворе до 30 мг/л инактивирует фермент на 40 %.

Понижение каталитической активности обусловлено структурными изменениями, т. е. денатурацией молекулы белка-фермента. Эффект денатурации в непосредственной близости от активного центра влияет на характер взаимодействия фермент—субстрат. Известно, что при денатурации белка проявляется гипсохромный эффект [5].

Рис. 2. УФ-спектры поглощения водных экстрактов зеленых листьев кле-на остролистного с различной массовой долей формальдегида в экстракте 1—0; 2—10; 3—20; 4—30 мг/л



На рис. 2 представлены УФ-спектры поглощения водных экстрактов. Увеличение светопоглощения D в ультрафиолетовой области спектра (~ 260 нм) обусловлено денатурацией белков-ферментов. Максимальная длина волны λ_{\max} смещается от 270 (в виде плеча) до 260 нм по мере увеличения содержания формальдегида. Кроме того, возрастает интенсивность поглощения.

Для изучения механизма процесса формальдегидной денатурации использовали легкодоступный белок альбумин. Образцы обрабатывали 20 %-м водным раствором CH_2O и подвергали термической обработке в течение 2 ч при температуре 110 °С. Контрольный образец подвергли только термической обработке при данной температуре. В этом случае протекает только процесс температурной денатурации белка.

Для выяснения строения исследуемых образцов белка были сняты ИК-спектры на спектрофотометре UR-20 в области $800 \dots 1800$ cm^{-1} (образцы в виде таблеток с KBr). На рис. 3 представлен ИК-спектр денатурированного белка. Интерпретацию спектра производили согласно [8]. В ИК-спектре образца после формальдегидной и термической обработки (кривая 2) обнаружены следующие колебательные частоты ν , cm^{-1} : 940, 1030, 1090, 1240, 1380, 1450, 1530, 1650.

ИК-спектр контрольного образца (кривая 1) резко отличается от исследуемого. Особый интерес представляет полоса поглощения при 1550 cm^{-1} .

Область спектра $900 \dots 1300$ cm^{-1} очень важна. Здесь проявляется поглощение $O—H$ -группы. Наблюдается полоса поглощения при 1240 cm^{-1} , являющаяся результатом взаимодействия между деформационными колебаниями $O—H$ и валентными колебаниями $C—O$.

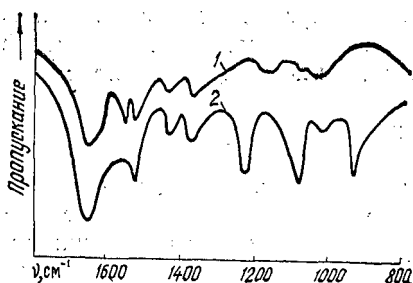
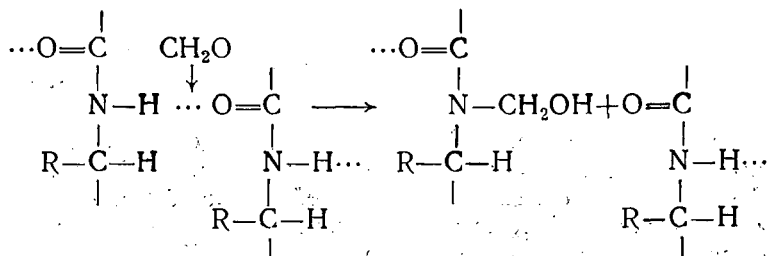


Рис. 3. ИК-спектры белка альбумина: 1 — после термической обработки при 110 °С; 2 — после предварительной обработки 20 %-м водным раствором формальдегида и последующей термической обработки при 110 °С

Полосы поглощения при 1090, 1030, 940 см^{-1} относятся к валентным колебаниям С—О, при 1530, 1450, 1380 см^{-1} — С—N.

Полоса поглощения 1550 см^{-1} (кривая 1) обусловлена взаимодействием между деформационными колебаниями N—H и валентными колебаниями С—N группы С—N—H.

Полоса поглощения карбонильной группы С=О наблюдается при 1650 см^{-1} . Отсутствие поглощения при 1550 см^{-1} (кривая 2) связано с протеканием химической реакции при участии N—H-группы, вследствие чего в молекуле белка появляется гидроксильная группа О—Н. Вероятно, полярные молекулы формальдегида адсорбируются и химически взаимодействуют с пептидной связью молекулы белка по следующей схеме:



При этом разрывается водородная связь, закрепляющая спираль полипептидной цепи, и образуется гидроксометильная группа —CH₂OH при атоме азота.

Все это ведет к нарушению структуры молекулы белка, в чем и проявляется эффект формальдегидной денатурации.

Было замечено, что белок после формальдегидной обработки обладает повышенной термической стойкостью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1]. Д'е Дюв К. Путешествие в мир живой клетки // Пер. с англ.—М.: Мир, 1987.—256 с. [2]. Добрынина В. И. Биологическая химия.—М.: Медицина, 1976.—504 с. [3]. Киселёв И. Я. Содержание формальдегида в листьях древесных растений // Лесн. журн.—1992.—№ 1.—С. 129—131.—(Изв. высш. учеб. заведений). [4]. Крамер П. Д., Козловский Т. Т. Физиология древесных растений // Пер. с англ.—М.: Лесн. пром-сть, 1983.—464 с. [5]. Кретович В. Л. Биохимия растений // Учеб. для биол. фак. ун-тов.—М.: Высш. шк., 1980.—445 с. [6]. Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия.—М.: Просвещение, 1987.—815 с. [7]. Огородников С. К. Формальдегид.—Л.: Химия, 1984.—271 с. [8]. Сильверстейн Р., Басслер Г., Моррил Т. Спектрометрическая идентификация органических соединений // Пер. с англ.; Под ред. А. А. Мальцева.—М.: Мир, 1977.—590 с.