

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІНІ ОБ'ЄКТИ

УДК 577.3

МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ ИНАКТИВАЦИИ СПОР *BACILLUS SUBTILIS* И *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS*

И.В. Нога, В.М. Шаталов

Донецкий национальный университет, ул. Щорса 46, Донецк, 83050. E-mail: nogainna@mail.ru
30 июля 2007 г.

На основе разработанной ранее методики получены параметры линейной кинетики инактивации спор *Bacillus subtilis* и *Bacillus stearothermophilus*. Энергия активации оказывается сравнимой с характерной энергией стабилизации белков. Сопоставление активационных барьеров и изменений объемов для вегетативных и споровых форм показывает, что активированное состояние для деградации белков связано с разрывом сетки водородных связей и заполнением водой внутренних полостей белка.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: высокое давление, кинетика, инактивация, микроорганизмы, денатурация, белки.

В наших предыдущих работах [1-6] было проведено комплексное исследование совместного воздействия высокого давления P (до 600 МПа), температуры T (до 60°C) и времени обработки t (до 30 мин) на жизнеспособность некоторых микроорганизмов. Эти исследования направлены на создание фундаментальных основ технологии стерилизации продуктов питания высоким давлением, обладающей рядом преимуществ по сравнению с традиционными методами консервации [7]. В результате было установлено, что давление порядка 500 МПа является пороговым для инактивации выявленных микроорганизмов, в то время как содержание витамина С при этом меняется незначительно [1, 3]. Процессы инактивации микроорганизмов и деградации витамина С успешно воспроизводятся в рамках линейной кинетики, где реакцию биосистемы на всевозможные сочетания факторов давления, температуры и времени обработки определяет набор трех параметров в формуле Аррениуса – предэкспоненциальный множитель A , активационный барьер реакции U и изменение удельного объема ΔV [2-4]. Наблюдаемая нелинейность в кинетике инактивации микроорганизмов, которая обычно приписывалась наличию барорезистивной части популяции, объясняется неравномерностью остывания нагретого при сжатии образца [5]. Нелинейность проявляется при временах малых по сравнению с характерным временем остывания, которое определяется геометрией камеры сжатия, отклонения от линейности растут с ростом давления обработки и скорости его подъема. Инактивация микроорганизмов высоким давлением может быть обусловлена сопутствующим ростом кислотности среды [6]. Одинаковые для многих микроорганизмов критические значения давления ~500 МПа (при 25°C) или температуры стерилизации ~60°C (при $P=0$) вызывают одинаковое уменьшение равновесного pH воды и соответствуют выходу за границы кислотного оптимума, полуширина которого составляет 1-2 единицы pH для большинства микроорганизмов.

Полученные результаты могут быть использованы для выбора оптимальных значений P , T и t и создают предпосылки для разработки отсутствующих на данный момент стандартов технологии обработки продуктов питания высоким давлением. Однако с точки зрения биофизики высоких давлений остается неясным, насколько широк класс объектов, для которых применима использованная модель, какие микропроцессы лежат в основе инактивации давлением.

Целью настоящей работы является применение этой методики к описанию инактивации спор и обсуждение механизма инактивации через изменение гидратации белков под давлением. Данные по инактивации спор *Bacillus subtilis* [8] и *Bacillus stearothermophilus* [9] используются для получения кинетических параметров инактивации на основе разработанной в [1-3] методики. Сопоставления полученных параметров с другими известными результатами позволяет уточнить микроскопический механизм действия давления.

МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ

Образцы с суспензией спор *Bacillus subtilis* ATCC 9372 подвергались воздействию высокого давления при разных температурах и временах выдержки [8], обработка осуществлялась двумя независимыми способами: с быстрым (5-30с) и медленным (2.5-20мин) подъемом давления. Затем из них готовились серии десятикратных разбавлений, которые высевались на питательный агар в

трех повторностях. Чашки с агаром инкубировались сутки при 37°C, после чего число выживших спор подсчитывалось по средним числам КОЕ/мл.

Споры *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 обрабатывались [9] в широком диапазоне давлений от 200 до 1400 МПа и температур от 90 до 130°C, в фосфорнокислом буферном растворе с pH=7.0. После обработки готовились серии разбавленных образцов и в двух повторностях высевались на стандартный питательный агар. Число выживших клеток определялось после 48 часов инкубации при 37°C.

Описывая кинетику инактивации мы исходим из того, что скорость деградации всего организма под действием высокого давления и температуры определяется, прежде всего, денатурацией белков [3]. Как показывает анализ экспериментальных данных [10], денатурация белков $N \rightarrow D$ является процессом активационного типа, то есть проходит через образование некоторого неустойчивого промежуточного соединения, называемого активированным комплексом $A^\#$: $N \rightarrow A^\# \rightarrow D$. Внешние изменения температуры T и/или давления P выводят систему из термодинамического равновесия. При этом разность свободных энергий для перехода $N \rightarrow D$ становится отличной от нуля $\Delta G \neq 0$, что стимулирует реакцию в прямом $N \rightarrow D$ или обратном $N \leftarrow D$ направлении при $\Delta G < 0$ или $\Delta G > 0$ соответственно. Как показывает опыт [10], скорости этих реакций достаточно малы, поэтому мы можем говорить о неполном термодинамическом равновесии [11] и воспользоваться формулой Аррениуса для константы скорости химической реакции k . Для учета действия давления к величине активационного барьера денатурации U следует добавить слагаемое, описывающее работу против внешних сил $P\Delta V$:

$$k = A \exp\left(-\frac{U + P\Delta V}{RT}\right), \quad (1)$$

где ΔV – изменение удельного объема N при переходе $N \rightarrow A^\#$. Если переход $A^\# \rightarrow D$ не связан с изменением объема, то ΔV характеризует изменение удельного объема при денатурации $N \rightarrow D$ и определяет смещение химического равновесия под давлением через изменение свободной энергии Гиббса

$$\Delta G = \Delta U - T\Delta S + P\Delta V. \quad (2)$$

При $\Delta V < 0$ ΔG падает с ростом давления, что вызывает сдвиг химического равновесия в сторону увеличения конечного продукта D в полном соответствии с принципом Ле-Шателье. Если при некотором достаточно высоком давлении свободная энергия реакции становится отрицательной $\Delta G < 0$, то термодинамически равновесному состоянию отвечает полный переход системы из N в D . Скорость такого перехода определяется константой скорости (1), которая также зависит от давления через высоту барьера $U + P\Delta V$. Таким образом, внешнее давление P влияет на равновесное отношение концентраций в нативном N и денатурированном D состояниях через слагаемое $P\Delta V$ в термодинамическом потенциале в (2), а также влияет на скорость денатурации через изменение активационного барьера $U + P\Delta V$ в (1).

В том случае, когда образование активированного комплекса $A^\#$ связано со структурными превращениями, изменением числа степеней свободы и т.п., к активационному барьеру реакции U следует добавить энтропийное слагаемое $-T\Delta S$. Величина ΔS – характеризует изменение энтропии для реакции $N \rightarrow D$ (если только переход $A^\# \rightarrow D$ не связан с изменением энтропии) и определяет смещение химического равновесия при сдвиге температуры через изменение свободной энергии Гиббса (2) а также влияет на скорость денатурации через изменение активационного барьера $U - T\Delta S$. Условие $\Delta G > 0$ определяет область стабильности (температурный оптимум) белка. Таким образом, температура T влияет на равновесное отношение концентраций в нативном N и денатурированном D состояниях через слагаемое $-T\Delta S$ в термодинамическом потенциале в (2), а также влияет на скорость денатурации через изменение активационного барьера $U - T\Delta S$. Некоторая функциональная асимметрия по отношению к влиянию давления связана с делением суммарного активационного барьера $U - T\Delta S + P\Delta V$ на RT в формуле Аррениуса. Однако изменение температуры ΔT в актуальной области температурного оптимума белка мало по сравнению с самой температурой T . Следовательно, можно ожидать, что кривые выхода реакции в зависимости от давления будут подобны температурным зависимостям с тем лишь отличием, что изменение давления ΔP для бароденатурации нельзя сделать отрицательным.

Инактивация микроорганизмов под действием повышенной температуры и давления рассматривается аналогично описанию кинетики денатурации белков как одноступенчатая химическая реакция. Под концентрацией реагирующего вещества будем понимать число микроорганизмов, выживших после обработки высоким давлением и повышенной температурой.

Изменение концентрации в зависимости от времени $C(t)$ описывается уравнением распада, поскольку в отличие от денатурации белков инактивация микроорганизмов, как правило, необратима. В том случае, когда внешние параметры обработки продукта не зависят от времени,

$$C(t) = C_0 \exp(-kt) \quad (3)$$

Для обработки и анализа экспериментальных данных вводим безразмерный параметр x как комбинацию факторов P , T и t , однозначно определяющих величину концентрации

$$C = C_0 \exp[-\exp(x)] \quad (4)$$

где

$$x = \ln \left[-\ln \left(\frac{C}{C_0} \right) \right] = \ln(At) - \frac{1}{RT} (U + P\Delta V) \quad (5)$$

Записывая равенство (5) для каждой экспериментальной точки мы получаем переопределенную систему линейных уравнений с тремя неизвестными $\ln(A)$, U и ΔV , которую решаем методом наименьших квадратов. Ценность полученного решения заключается в том, что с помощью всего лишь трех параметров можно получить реакцию системы на любое сочетание внешних воздействий P , T и t .

РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТОВ

Для получения параметров инактивации спор *Bacillus subtilis* были использованы табличные данные [8], полученные в случае быстрого подъема давления. Для спор *Bacillus stearothermophilus* набор точек был восстановлен по отдельным графикам на Рис.3.2.3.3 из [9]. Эти данные по выживаемости спор под давлением были обработаны по вышеописанной методике. Полученные значения термодинамических параметров приведены в Табл. 1. Для сравнения рядом приведены полученные ранее параметры инактивации для мезофильно-аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАМ), выявленных в вишневом соке [3] и в яблочном пюре [4].

Табл. 1. Рассчитанные параметры инактивации спор *Bacillus subtilis* и *Bacillus stearothermophilus* в сравнении с результатами для вегетативных форм

Объект	$\ln(A \cdot t \text{сек})$	U , ккал/моль	ΔV , мл/моль
Споры <i>Bacillus subtilis</i>	17.3	15.6	-9.97
Споры <i>Bacillus stearothermophilus</i>	18.6	17.8	-9.18
МАФАМ в вишневом соке [3]	13.5	15.9	-35.5
МАФАМ в яблочном пюре [4]	13.6	13.4	-25.1
Плесень в вишневом соке [3]	7.91	12.9	-38.7

На Рис. 1 и 2 рассчитанные с этими параметрами теоретические кривые сравниваются с усредненными по всем повторностям экспериментальными точками. В целом наблюдается вполне удовлетворительное согласие. Теоретические кривые правильно передают как масштабы изменения концентрации под давлением, так и тенденции, связанные с изменением температуры и времени обработки. Таким образом, возможности используемой кинетической модели не ограничиваются вегетативными формами [1-4].

Как видно из Табл. 1, значения активационного барьера U оказываются примерно одинаковыми для всех объектов. Можно предположить, что это одна и та же величина и, следовательно, активационный барьер инактивации различных микроорганизмов определяется одним и тем же процессом, не связанным с их размером, массой или формой. Как известно, значения свободной энергии стабилизации различных белков также разбросаны в весьма узком интервале (от 10 до 20 ккал/моль) [21] и явно не зависят от размеров белка. Приведенные в Табл. 1 значения энергии активации U попадают в указанный интервал для энергий стабилизации, что представляет весьма удивительным и заставляет думать, что одни и те же события на микроскопическом уровне ответственны как за стабилизацию структуры белков относительно распада $N \rightarrow D$, так и за переход в активированное состояние $N \rightarrow A^{\#}$, из которого происходит спонтанная денатурация $A^{\#} \rightarrow D$.

Значения изменения удельного объема ΔV для всех объектов Табл. 1 по порядку величины совпадают с характерными значениями ΔV для белков (см., например, [10]), что подтверждает наше предположение о том, что инактивация микроорганизмов обусловлена деградацией белков [3]. Величины ΔV для разных вегетативных форм получились примерно одинаковыми. То же

самое можно сказать о спорах, причем ΔV для спор заметно меньше. Это еще одно подтверждение связи инактивации микроорганизмов с деградацией белков, поскольку в спорах белки упакованы более плотно, в них отсутствуют или минимизированы полости, заполняемые водой при разворачивании.

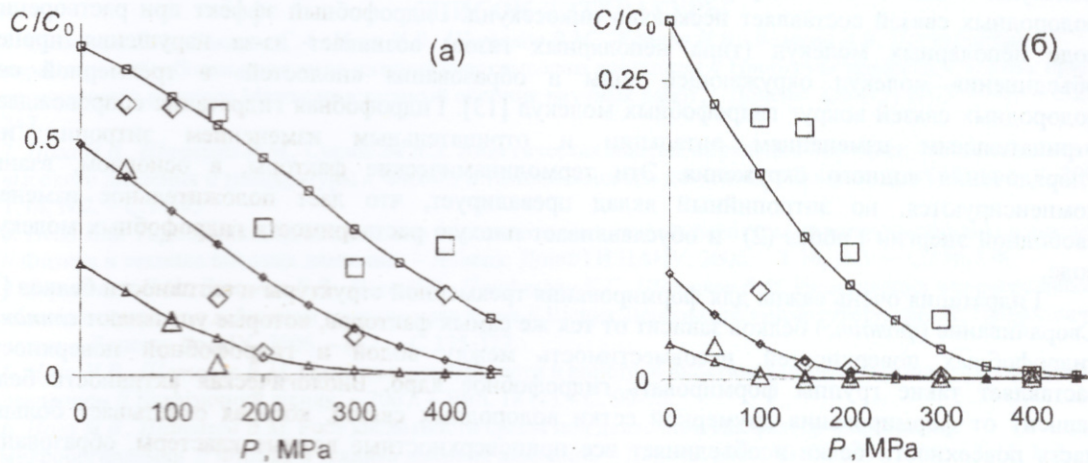


Рис. 1. Выживаемость (относительные числа КОЕ) спор *Bacillus subtilis* в зависимости от давления P при различных температурах T и временах обработки t , крупные маркеры – эксперимент [8], кривые с маркерами – расчет при тех же условиях:
а) $T=30^\circ\text{C}$, \square – $t=30$, \diamond – $t=60$ и Δ – $t=120$ мин;
б) $T=60^\circ\text{C}$, \square – $t=10$, \diamond – $t=20$ и Δ – $t=30$ мин.

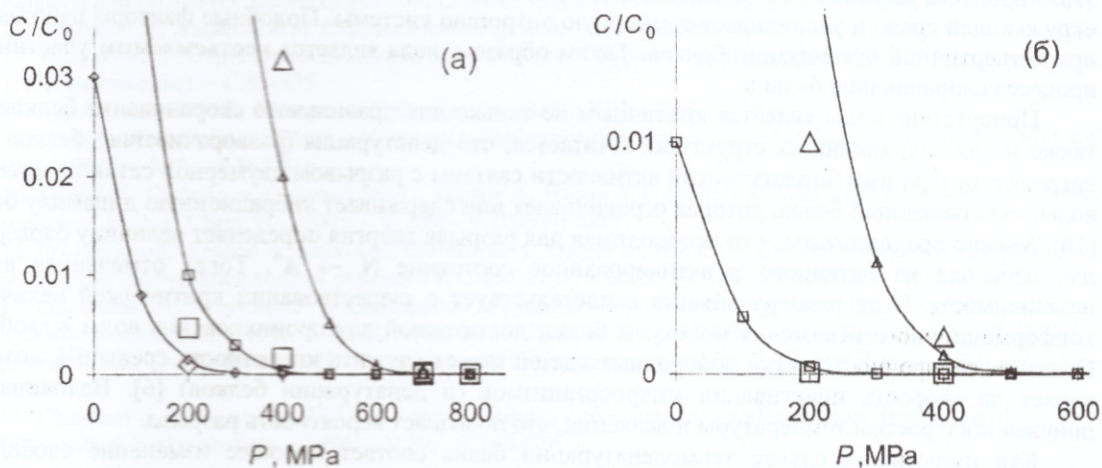


Рис. 2. Выживаемость (относительные числа КОЕ) спор *Bacillus stearothermophilus* в зависимости от давления P при различных температурах T и временах обработки t , крупные маркеры – эксперимент [9], кривые с маркерами – расчет при тех же условиях:
а) $T=100^\circ\text{C}$, Δ – $t=5$, \square – $t=10$, \diamond – $t=15$ мин;
б) $T=110^\circ\text{C}$, Δ – $t=5$, \square – $t=10$ мин.

Это наблюдение дает нам еще один довод в пользу того, что образование активированного состояния перед денатурацией белка $N \rightarrow A^\#$ связано с открытием доступа воды во внутренние полости белка, поскольку заполнение их водой дает основной вклад в уменьшение объема. После заполнения полостей становятся возможными макроперемещения пептидных цепей, что, по сути, и является денатурацией. Объем на этом шаге $A^\# \rightarrow D$ не меняется, поэтому изменение объема ΔV при активации промежуточного состояния $N \rightarrow A^\#$ оказывается равным изменению объема для равновесной реакции $N \rightarrow D$. Таким образом, проведенный анализ помогает нам сделать выводы о микроскопических процессах, с которыми связана инактивация микроорганизмов давлением.

ОБСУЖДЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ДАВЛЕНИЯ

Современный взгляд на структуру воды [12] заключается в том, что в ней существует единая трехмерная сетка водородных связей, соединяющих соседние молекулы. Устройство этой сетки не похоже на структуры каких-либо кристаллов, она структурно и динамически неоднородна, молекулы воды в ней непрерывно меняют своих соседей, так что среднее время жизни водородных связей составляет несколько пикосекунд. Гидрофобный эффект при растворении в воде неполярных молекул (типа неполярных газов) возникает из-за нарушения процесса объединения молекул окружающей воды и образования «полостей» в трехмерной сетке водородных связей вокруг гидрофобных молекул [13]. Гидрофобная гидратация сопровождается отрицательным изменением энтальпии и отрицательным изменением энтропии из-за упорядочения водного окружения. Эти термодинамические факторы, в основном, взаимно компенсируются, но энтропийный вклад превалирует, что дает положительное изменение свободной энергии Гиббса (2) и обуславливает плохую растворимость гидрофобных молекул в воде.

Гидратация очень важна для формирования трехмерной структуры и активности белков [14]. Сворачивание (*фолдинг*) белков зависит от тех же самых факторов, которые управляют *слипанием* гидрофобных поверхностей, несовместимость между водой и гидрофобной поверхностью заставляет такие группы формировать гидрофобное ядро. Биологическая активность белков зависит от формирования двумерной сетки водородных связей, которая охватывает большую часть поверхности белка и объединяет все приповерхностные водные кластеры, образованные водородными связями [15]. Считается, что такая водная сетка может передавать информацию вокруг белка и управлять динамикой белка, например, движением его доменов.

Гидрофобные взаимодействия в белках обусловлены уменьшением энтропии при контакте неполярных групп с водой. Несовместимость гидрофобной поверхности с водой уменьшенной плотности, которая образуется над такой поверхностью, стимулирует минимизацию площади взаимодействия, что приводит к формированию третичной структуры белков. Движущей силой этого процесса является освобождение и выход воды, которая затем гидратирует другие центры в окружающей среде и увеличивает суммарную энтропию системы. Подобные факторы работают и при четвертичной организации белков. Таким образом, вода является неотъемлемым участником процесса сворачивания белков.

Присутствие воды является критичным не только для правильного сворачивания белков, но также и для сохранения их структуры. Считается, что денатурация (*разворачивание*) белков при нагреве и потеря ими биологической активности связаны с разрывом двумерной сетки из молекул воды, охватывающей белок, которая ограничивает или сдерживает вибрационную динамику белка [16]. Можно предположить, что необходимая для разрыва энергия определяет величину барьера U для перехода из нативного в активированное состояние $N \rightarrow A^{\ddagger}$. Тогда отмеченная выше независимость U от размера объекта свидетельствует о существовании критической величины конформационного искажения молекулы белка, достаточной для проникновения воды в глобулу. Показателем прочности сетки водородных связей может служить кислотность среды pH, которая влияет на скорость инактивации микроорганизмов (и денатурации белков) [6]. Величина pH понижается с ростом температуры и давления, что повышает вероятность разрыва.

Как известно, в случае термоденатурации белка соответствующее изменение свободной энергии ΔG формируется совместными эффектами сворачивания/разворачивания и сопутствующими изменениями гидратации неполярных и полярных групп белка. Эти вклады в значительной мере компенсируют друг друга, так что свободная энергия стабилизации типичного белка $\Delta G = \Delta H_{\text{nonpolar}} + \Delta H_{\text{polar}} - T\Delta S_{\text{nonpolar}} - T\Delta S_{\text{polar}}$ составляет всего 10-20 ккал/моль, тогда как изменения энтальпии $\Delta H_{\text{nonpolar}}$ и ΔH_{polar} (и умноженные на температуру изменения энтропии $T\Delta S_{\text{nonpolar}}$ и $T\Delta S_{\text{polar}}$) могут различаться более чем на ± 120 ккал/моль [13, 17].

Суммируя аналогичным образом характерные изменения вкладов от разворачивания полярных и неполярных групп в случае бароденатурации, получаем энергию Гиббса для перехода белка из нативного в денатурированное состояние $\Delta G = \Delta F_{\text{nonpolar}} + \Delta F_{\text{polar}} + P\Delta V_{\text{cavities}} + P\Delta V_{\text{nonpolar}} + P\Delta V_{\text{polar}}$. Область давлений выше некоторого критического давления $P > P_c$ соответствует денатурированному состоянию белка. Скорость денатурации при попадании системы в эту область определяется величиной активационного барьера, слагаемое U в котором одинаково для термо- и бароденатурации и связано с разрывом двумерной сетки водородных связей. Влияние давления на скорость денатурации определяется суммарным изменением объема при заполнении водой внутренних полостей белка и гидратации развернутых полярных и неполярных групп $\Delta V = \Delta V_{\text{cavities}} + \Delta V_{\text{nonpolar}} + \Delta V_{\text{polar}}$. Область существования нативного состояния $P < P_c$ определяет оптимум активности белка под давлением. Очевидно, что P_c существенно

меньше пороговых значений инактивации (~500МПа для большинства микроорганизмов). Парадокс малого изменения удельного объема ΔV в больших белковых молекулах [18] объясняется почти полной взаимной компенсацией вкладов от полярных ΔV_{polar} и неполярных групп $\Delta V_{\text{nonpolar}}$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сукманов В.А., Соколов С.А., Нога И.В., Шаталов В.М., Жданов И.В., Волкова А.В. Оптимизация параметров обработки продуктов питания сверхвысоким давлением // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона: Межведомственный сборник научных работ. – Донецк: ДонНУ, 2003. – N.3. – С.238-247.
2. Нога И.В., Шаталов В.М., Сукманов В.А. Кинетическая модель деградации биомолекул под воздействием высокого давления и температуры // Физика и техника высоких давлений. – Донецк: ДонФТИ НАНУ, 2004. – Т.14, N.2. – С.74-85.
3. Нога И.В. Термодинамика воздействия высокого давления и температуры на микроорганизмы и витамины // Физика и техника высоких давлений. – Донецк: ДонФТИ НАНУ, 2006. – Т.16, N.3. – С.126-136.
4. Борисенко И.Н., Ветрова Е.В., Нога И.В., Панфилова Е.Г., Шаталов В.М. Инактивация микроорганизмов в яблочном поре под действием высокого давления // Вісник Донецького університету, сер. А: Природничі науки. – Донецк: ДонНУ, 2006. – N.2. – С.375-377.
5. Нога И.В., Шаталов В.М. Причины нелинейности в кинетике инактивации микроорганизмов под давлением // Біофізичний вісник. – 2007. – Вип. 18 (1). – С. 90-95.
6. Нога И.В., Шаталов В.М. Рост кислотности среды под давлением как фактор инактивации микроорганизмов // Физика и техника высоких давлений. – Донецк: ДонФТИ НАНУ, 2007. – Т.17, N.2. – С.131-137.
7. Farr D. High pressure technology in the food industry // Trends Food Sci Technol. Int. – 1995. – 1. – P. 75-80.
8. Urzica A.C. High hydrostatic pressure inactivation of *Bacillus subtilis* var. niger. spores: the influence of the pressure build-up rate on the inactivation: Inag. – dis. – Heidelberg: Ruprecht-Karls-Univers., 2004. – 122 P.
9. Ardia A. Process Considerations on the Application of High Pressure Treatment at Elevated Temperature Levels for Food Preservation: Genchem. – dis. – Berlin: Technischen Univers., 2004. – 94 P.
10. Prehoda K. E., Mooberry E. S., Markley J. L. High Pressure Effects on Protein Structure, In *Protein Dynamics, Function and Design* (O. Jardetzky and J.-F. Lefevre, Eds.), NATO ASI Series, Plenum Press, 1998. – P.59-86.
11. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Статистическая физика. – М.: «Наука», 1964. – 568с.
12. Маленков Г.Г. Структура и динамика жидкой воды // Журнал структурной химии. – 2006. – Т.47(Приложение). – С.55-535.
13. Функельштейн А.В., Птица О.Б. Физика белка//М.: КДУ, 2005. – 456 С.
14. Chaplin M. F. Opinion: Do we underestimate the importance of water in cell biology? // Nature Rev. Mol. Cell Biol. – 2006. – V.7. – P.861-866.
15. Smolin N., Oleinikova A., Brovchenko I., Geiger A., Winter R. Properties of spanning water networks at protein surfaces // J. Phys. Chem. B. – 2005. – V.109. – P.10995-11005.
16. Brovchenko I., Krakau A., Smolin N., Oleinikova A., Geiger A., Winter R. Thermal breaking of spanning water networks in the hydration shell of proteins // J. Chem. Phys. – 2005. – V.123. – P.224905.
17. Makhtadze G. I., Privalov P. L. Contribution of hydration to protein folding thermodynamics I. The enthalpy of hydration J. Mol. Biol. – 1993. – V.232. – P.639-657. Privalov P. L., Makhtadze G. I. Contribution of hydration to protein folding thermodynamics II. The entropy and Gibbs energy of hydration // J. Mol. Biol. – 1993. – V. 232. – P.660-679.
18. Chalikian T. V., Breslauer, K. J. On Volume Changes Accompanying Conformational Transitions of Biopolymers // Biopolymers. – 1996. – V.39. – P.619-626.