

## ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СТРОЕНИЯ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ЛИПАЗЫ RHIZOPUS JAPONICUS

© 2001 г. Т.А. Ковалева, С.А. Шеламова\*, О.Д. Трофимова, Н.А. Бондарева\*

*Воронежский государственный университет*

*\* Воронежская государственная технологическая академия*

С помощью методов Диксона и химической модификации выявлена роль имидазольной группы гистидина,  $\omega$ -карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой кислот, сульфгидрильных групп цистеина в гидролизе триглицеридов. Показано, что этилендиаминтетраацетат является неконкурентным ингибитором липазы.

### ВВЕДЕНИЕ

Исследование физико-химических свойств ферментов составляет одну из наиболее важных задач молекулярной биологии. Ферменты, как правило, значительно превосходят катализаторы небиологического происхождения по скорости реакции, специфичности действия, избирательности к структуре субстрата.

В последнее время возрос интерес к исследованию липолитических ферментов. Помимо того очевидно значения, которое липолитические ферменты имеют в связи со своей биологической ролью, немалый интерес представляет их практическое применение в пищевой и других отраслях промышленности. Главным образом это относится к липазам микробного происхождения, характеризующимися высокой активностью и низкой себестоимостью.

Основной особенностью ферментативной реакции является то, что она протекает в составе активного комплекса, образованного в результате связывания субстрата с активным центром фермента.

В формировании активного центра ферментов принимают участие отдельные аминокислотные остатки, содержащие разнообразные по реакционной способности функциональные группы (гистидина, лизина, аргинина, триптофана и др.).

В этой связи целью нашей работы явилось исследование особенностей строения активного центра фермента липазы из актиномицета *Rhizopus japonicus*.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали фермент липазу, выделенную из *Rhizopus japonicus* 1403 на кафедре микробиологии и биохимии Воронежской государственной технологической академии из культуральной жидкости осаждением ацетоном; в качестве субстрата использовали трибутирин.

Каталитическую активность фермента определяли спектрофотометрическим методом Anderson and

McCarthy [1], содержание белка в препарате – методом Lowry [2]. Определение количества SH-групп проводили методом Thannhauser et al.[3].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Опыты показали, что каталитическая активность липазы составила 15 ед/мг, содержание белка 270мг/г препарата. Оптимальная температура реакции гидролиза находится в диапазоне 30-37°C, оптимальное значение pH – 6,5 единиц.

Широко используемым методом для получения предварительных данных при идентификации функциональных групп активного центра фермента является анализ зависимости скорости реакции катализа от pH среды [4, 5].

В этой связи было исследовано влияние концентрации субстрата на активность фермента при различных значениях pH (5,0-8,0) и определены значения основных кинетических параметров  $K_m$  и  $V_{max}$  (табл. 1).

*Таблица 1*

**Величины константы Михаэлиса и максимальной скорости ( $K_m$  и  $V_{max}$ ) для реакции гидролиза субстрата растворимой липазой при различных значениях pH**

pH	$K_m \cdot 10^{-3}$ , моль/дм <sup>3</sup>	$V_{max}$ , мкмоль/мин
5,0	1,85 ± 0,01	20,40 ± 0,11
6,0	3,00 ± 0,05	32,20 ± 0,13
6,5	3,22 ± 0,07	71,42 ± 0,20
7,0	3,57 ± 0,04	76,92 ± 0,22
7,5	3,55 ± 0,08	66,67 ± 0,16
8,0	1,82 ± 0,02	14,49 ± 0,14

Графическая обработка данных, предложенная М. Диксоном, в координатах  $\lg V_{max}$  и  $\lg K_m$  от значения pH позволила определить константы ионизации функциональных групп активного центра липазы:  $pK_{E_1} = 6,5$ ;  $pK_{E_2} = 7,5$  (рис.).

Найденное значение  $pK_{E_1} = 6,5$  соответствует pH имидазольной группы метилгистидина.

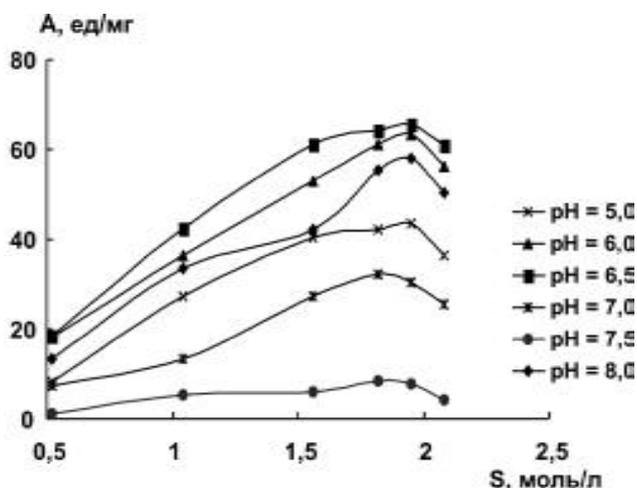


Рис. Зависимость каталитической активности липазы от концентрации субстрата при различных значениях pH

Таким образом, исследование зависимости активности фермента от концентрации субстрата при различных величинах pH позволяет предположить, что в состав активного центра фермента входит имидазольная группа метилгистидина.

Для подтверждения участия имидазола в процессе катализа мы исследовали влияние фотоокисления гистидина и триптофана на каталитическую активность липазы (табл. 2). При наличии в каталитическом центре фермента имидазола гистидина фотоокисление в присутствии метиленовой сини должно привести к инактивации фермента, что и наблюдалось в наших экспериментах. Следует отметить, что наряду с имидазолом интенсивному окислению подвергается индольное кольцо триптофана.

Таблица 2

**Влияние фотоокисления гистидина в присутствии метиленовой сини на каталитическую активность липазы**

Концентрация субстрата, %	А, ед/мг	
	без метиленовой сини	в присутствии метиленовой сини
30	28,98 ± 0,31	0,10 ± 0,01
40	42,28 ± 0,19	0,11 ± 0,01
50	53,30 ± 0,15	0,10 ± 0,02
60	61,14 ± 0,23	0,04 ± 0,01
70	64,28 ± 0,11	0,07 ± 0,01

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что имидазольное кольцо гистидина играет существенную роль в расщеплении молекулы триглицеридов.

По мнению Aleshin A.E. et al. [6], триптофан играет ключевую роль в стабилизации центров связывания при катализе гидролитическими ферментами. При дегликозилировании глюкоамилазы и модификации Trp-120 каталитическая активность исчезала полностью. Эти данные позволяют нам сделать предположение о наличии в активном центре липазы молекулы триптофана.

В состав активных центров гидролаз могут входить SH-группы остатков цистеина. Они также участвуют в связывании субстратов и кофакторов, а также в стабилизации каталитически активной конформации молекулы фермента [7, 8]. В этой связи мы определили методом Thannhauser T. W. [3] количество SH-групп в молекуле липазы и исследовали влияние их блокирования на каталитическую активность фермента.

Для количественного определения SH-групп использовали п-хлормеркурибензоат, калибровочную прямую строили по цистеину.

Расчеты показали, что в молекуле растворимой липазы содержится 4 поверхностных SH-группы.

Полученные результаты подтверждают данные Н. Mogueau et al., изучавшим действие SH-реагентов на липазу, выделенную из желудочной ткани. Обработка липазы дитионитробензолом приводит к модификации SH-групп фермента и его инактивации [9].

Tahoun M. et al. исследовали механизм ингибирования эндолипазы из *Rhizopus delemar* ионами тяжелых металлов Hg<sup>2+</sup> и Pb<sup>2+</sup>, блокирующими поверхностные SH-группы фермента [10].

При блокировании п-хлормеркурибензоатом SH-групп наблюдалась частичная инактивация липазы. Очевидно, это связано с изменением нативной конформации белка, затрагивающей активный центр (табл. 3).

Таблица 3

**Влияние блокирования SH-групп п-хлормеркурибензоатом на каталитическую активность липазы**

Концентрация субстрата, %	А, ед/мг	
	Нативная липаза	в присутствии ПХМБ
30	28,98 ± 0,14	0,18 ± 0,01
40	42,28 ± 0,19	1,04 ± 0,01
50	53,30 ± 0,15	0,98 ± 0,02
60	61,14 ± 0,23	1,25 ± 0,04
70	64,28 ± 0,11	0,93 ± 0,04

При увеличении концентрации субстрата мы наблюдали повышение активности фермента. По-видимому, это связано с экранирующим действием субстрата по отношению к ингибитору.

Анализ литературных данных показывает, что липазы относятся к числу тиоловых ферментов [9, 10]. Общей чертой механизма действия SH-ферментов является совместное участие SH-группы и имидазола, а также взаимодействие между SH-группами ферментов и карбонильными группами субстратов. Это может быть справедливо и по отношению к липазе.

В исследовании металлоферментов представляет особый интерес отделение металла от апофермента, сопровождающееся исчезновением или снижением ферментативной активности, а также последующая реактивация фермента путем добавления металла.

В этой связи было изучено влияние ЭДТА, связывающего ионы двухвалентных металлов, на каталитическую активность липазы из *Rhizopus japonicus*

(табл. 4). Показано, что при взаимодействии липазы с ЭДТА (концентрация  $10^{-5}$  моль/л) достоверного снижения каталитической активности фермента не происходит. Уменьшение способности липазы расщеплять триглицериды мы наблюдали при воздействии ЭДТА в концентрации  $10^{-4}$  моль/л. Максимальный ингибирующий эффект ЭДТА  $10^{-2}$  моль/л.

Таблица 4

**Зависимость каталитической активности липазы от концентрации ЭДТА**

Фермент	A, ед/мг
Нативная липаза	13,63±0,20
С ЭДТА $10^{-5}$ моль/л	13,58±0,13
С ЭДТА $10^{-4}$ моль/л	11,53±0,18
С ЭДТА $10^{-3}$ моль/л	9,36±0,15
С ЭДТА $10^{-2}$ моль/л	8,44±0,27

Для исследования механизмов ингибирования липазы нами была изучена зависимость активности фермента от концентрации субстрата в присутствии ЭДТА (в концентрациях  $10^{-3}$  и  $10^{-2}$  моль/л). В данном случае наблюдается снижение каталитической активности на протяжении всего хода кинетической кривой.

Максимальный ингибирующий эффект мы наблюдали при концентрации ЭДТА  $10^{-2}$  моль/л. При этом форма зависимости скорости реакции гидролиза триглицеридов от концентрации субстрата не изменяется по сравнению с нативной формой. По результатам исследования воздействия ЭДТА на кинетику ферментативного расщепления были определены  $V_{max}$  и  $K_m$  методом Лайнуивера-Берка (табл. 5). Обнаружено, что ЭДТА является неконкурентным ингибитором липазы, о чем свидетельствует снижение  $V_{max}$  реакции гидролиза триглицеридов под действием этого химического агента, причем значение  $K_m$  остается неизменным.

Таблица 5

**Кинетические характеристики гидролиза трибутирина липазой при воздействии ЭДТА**

Фермент	$K_m$ , моль/л	$V_{max}$ , мкмоль/мин
Нативная липаза	1,54	30,30±0,21
С ЭДТА $10^{-3}$ моль/л	1,54	21,74±0,16
С ЭДТА $10^{-2}$ моль/л	1,55	17,85±0,36

Из литературы известно, что гидролитические ферменты, в том числе и липазы, содержат в активном центре  $\omega$ -карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот [12]. Для исследования роли карбоксилатов в липолизе мы использовали метод химической модификации липазы дициклогексилкарбодиимидом. Выбор данного реагента обусловлен тем, что карбодиимид является наиболее эффективными реагентами для модификации карбоксильных групп в белках в мягких условиях.

В этой связи в следующей серии экспериментов нами было исследовано влияние различных концентраций

карбодиимида ( $10^{-5}$ – $10^{-1}$  моль/л) на каталитическую активность липазы (табл. 6). Концентрации модификатора  $10^{-5}$  и  $10^{-4}$  моль/л приводят к понижению активности фермента на 22% и 30% соответственно. При концентрации  $10^{-3}$  моль/л активность снижается наполовину, а при концентрациях  $10^{-2}$  и  $10^{-1}$  моль/л мы наблюдаем значительное падение каталитической активности (на 59% и 83% соответственно). Полученные результаты свидетельствуют о значительном вкладе карбоксильных групп в реакцию гидролиза триглицеридов.

Таблица 6

**Зависимость каталитической активности липазы от концентрации карбодиимида**

Фермент	A, ед/мг
Нативная липаза	13,63±0,20
С карбодиимида $10^{-5}$ моль/л	11,78±0,20
С карбодиимида $10^{-4}$ моль/л	10,60±0,25
С карбодиимида $10^{-3}$ моль/л	7,61±0,15
С карбодиимида $10^{-2}$ моль/л	6,22±0,16
С карбодиимида $10^{-1}$ моль/л	2,58±0,22

Анализируя данные, полученные методами Диксона и химической модификации, мы пришли к заключению, что для проявления каталитической активности липазы из *Rhizopus japonicus* существенную роль играют следующие аминокислотные остатки: имидазольная группа гистидина,  $\omega$ -карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот. Частичная инактивация фермента при блокировании сульфгидрильных групп свидетельствует об их вкладе в поддержание каталитически активной конформации белка. Этилендиаминтетраацетат ингибирует каталитическую активность липазы по неконкурентному механизму, что подтверждает предположение об участии ионов двухвалентных металлов в гидролизе триглицеридов.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Anderson M., McCarthy R. Rapid and sensitive assay for free fatty acids using rodamine 6G // *Anal. Biochem.* 1972. V. 45. №3. P.260 – 270.
2. Грачева И.М., Грачев Ю. П. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. М.: Легкая и пищевая промышленность. 1978. 271 с.
3. Thannhauser T.W., Konishi Y., Scheraga H.A. Sensitive quantitative analysis of disulfide bond in polypeptides and proteins // *Anal. Biochem.* 1984. V. 138. № 1. P. 181-188.
4. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир. 1979. 120 с.
5. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. – М.: Мир. 1982. Т. 1. 389 с.
6. Refined crystal structure of glucoamilase from *Aspergillus awamori* var. X100 / A.E. Aleshin, C. Hoffmann, L.M. Firsov et al. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 238. P. 575-591.
7. Торчинский Ю.М. Сера в белках. – М.: Наука, 1977. – 302 с.

8. *Richardson I.S.* The anatomy and taxonomy of protein structure // *Adv. Prot. Chem.* 1981. V. 34. P. 167-339.
9. *Moreau M., Gargouri X.* Importance of suffhydryl group for rabbit gastric lipase activity // *J. Mol. Biol.* 1988. V. 98. № 9. P. 1050-1054.
10. *Tahoun M.K., Mashaley R., Ismail A.A.* The mechanism of *Rhizopus delemar* intracellular lipases inhibition by various chemicals // *Microbios.* – 1988. V. 53. № 216-217. P. 139-146.
11. *Брокерхоф Х., Дженсен Р.* Липолитические ферменты. М.: Мир. 1978. 396 с.
12. *Поляновский О.Л.* Роль функциональных групп белка в ферментах // *Ферменты.* М.: Наука. 1964. С. 101–118.