

ТЕРМОИНАКТИВАЦІЯ α -ГАЛАКТОЗИДАЗИ *Penicillium canescens*

Н. В. БОРЗОВА, Л. Д. ВАРБАНЕЦ

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ;
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Ісследовані кінетика і механізм термоінактивації α -галактозидази *Penicillium canescens* в діапазоні температур 55–65 °С. Предложена кінетическа схема термоінактивації ензиму, включаюча обортиму диссоціацію активних гексамерів на асоціюючі мономеру і необротиму денатурацію мономерів. Рассчитані кінетическі константи термоінактивації ензиму. Ізучена зависимость процесу термоінактивації от степені очістки і концентрації ензиму. Показана можливість зашити протеїнової молекули от термоінактивації в присутстві БСА, гліцерола, мелібіози, раффінози і стахіози.

Ключеві слова: α -галактозидаза, *Penicillium canescens*, термоінактивація, константи термоінактивації.

α -Галактозидаза (КФ 3.2.1.) – ензим високоспецифічний по отношению к термінальним α -1,3-связанним галактозним остаткам олигосахаридів, гліколіпидів і глікопротеїнів. Она находіть примененіє во многих областях, в частности широко іспользується в пищевой промисленности для улучшения качества соевих продуктів (гидролізує неусвояєміє галактозиди раффінози і стахіози) [1, 2], в процесіх переробки сирья для увеличения выхода сахара из мелассы [3]. Большіє перспективу откриваються в іспользованні α -галактозидазы для біотрансформации эритроцитів крові человека группы В (III) в универсальніє донорськіє эритроциты і в ензимотерапії некоторых врожденных нарушений обмена сфинголіпидів [4, 5].

Знаніє механізму термоінактивації ензимів особливо важно при выборе стратегии его термостабілізації, т.к. подобрав условия стабілізації можно расширīt область примененія ензимів в различных технологических процесіх.

Цель работы – ісследование термоінактивації высокоактивной і высокоспецифічної α -галактозидазы, выделенной ранее из культуры мицелиального гриба *Penicillium canescens*, а также ізученіє возможности повышения ее термостабіліности.

Матеріали і методи

В работе іспользована внеклеточная α -галактозидаза *P. canescens*, очищенная на заряженных і нейтральных ТСК-гелях как описано ранее [6]. Также іспользовали частично очищенный препарат ензиму, полученный в

результате фракціонирования сульфатом аммония (30 і 90%-го насыщения), і культуральную жидкость продуцента.

Термоінактивацію α -галактозидазы *P. canescens* ісследовали в діапазоні температур 55–65 °С при рН 5,7 (1,0 мМ фосфатно-цитратный буфер (ФЦБ)).

Концентрацію различных форм ензиму от времени рассчитывали следующим образом: [E] – активный ензим ($E = RA$ (активность после термообработки); [R] – обортимо інактивированный ензим, количество ензиму способного к реінактивації ($[R] = RAR - RA$); RAR – активность после реінактивації); [I] – необротимо інактивированный ензим ($[E]_0 - RAR$).

Активность α -галактозидазы определяли с помощью субстрата реакции – *n*-нітрофеніл- α -D-галактопіранозіда (Sigma, США) [7]. За единицу активности принимали такое количество ензиму, которое гидролізує 1 мкмоль субстрата в минуту в условиях опыта.

Кінетика термоінактивації. Образцы ензиму 0,9–22 Е/мл в 1,0 мМ ФЦБ (рН 5,7) выдерживали при различных температурах в течение трех часов. Через определенные промежутки времени (10–30 мин) отбирали аликвоты по 0,1 мл і ізмеряли α -галактозидазную активность. Для реінактивації после термообработки образцы інкубировали при 40 °С в течение 5–24 часов.

При обработке ензиму глутаровым альдегидом к 1 мл раствора очищенного ензиму (10 Е/мл) добавляли 10–50 мкл 50%-го глутарового альдегіда і выдерживали при комнатной температуре в течение 15–60 мин, ос-

татки реагента удаляли гель-фильтрацией на Sepharose 6В. Далее обработку проводили как описано выше.

Углеводы (галактоза, глюкоза, мальтоза, сахароза, трегалоза, мелибиоза, раффиноза, стахиоза), сухую бычью кровь и БСА использовали в концентрации 0,5%, глицерин — 5–40%.

Изучение кинетики и расчет констант термоинактивации проводили в соответствии с работой [8]. Для расчета эффективной константы скорости денатурации $k_{ден}$ и константы диссоциации $K_{дис}$ строили кинетические кривые термоинактивации в полулогарифмических координатах $\ln v_t/v_0$ от t , где v_0 — скорость реакции при $t = 0$. По пересечению касательных, проведенных к линейным участкам кинетической кривой определяли точку излома при $t = \tau$. По тангенсам углов наклона касательных определяли $k_{эфф}$ (константы скорости диссоциации олигомера и ассоциации мономеров). Расчет $K_{дис}$ проводили по формуле:

$$K_{дис} = 4 [E_0] (v_0 - v_\tau)^2 / v_0 v_\tau,$$

где E_0 — концентрация олигомерной формы энзима в начальный момент времени, v_0 и v_τ — максимальные скорости контрольной каталитической реакции в начальный момент времени и в момент времени τ , отвечающий точке излома.

Константу скорости денатурации $k_{ден}$ определяли по формуле:

$$k_{ден} = k_{эфф} (v_0 + v_\tau) / 2(v_0 - v_\tau).$$

Результаты и обсуждение

Проведены исследования термоинактивации α -галактозидазы *P. canescens* в диапазоне температур 50–65 °С при рН 5,7. Определена зависимость этого процесса от степени очистки энзима, для чего использовали как неочищенную культуральную жидкость продуцента, так и частично очищенные препараты α -галактозидазы. Показано, что уровень активности прямо зависит от времени инкубации энзима при определенной температуре (рис. 1).

Следует отметить, что наблюдается лишь частичная реинактивации энзима (инкубация при 40 °С в течение 5 ч) после инактивации при этих температурах (рис. 2). Вероятно, у энзима после его обработки при 65 °С проходит инактивация, связанная с необратимыми конформационными изменениями протеиновой структуры.

Полученные результаты позволяют предположить наличие, по крайней мере, трех

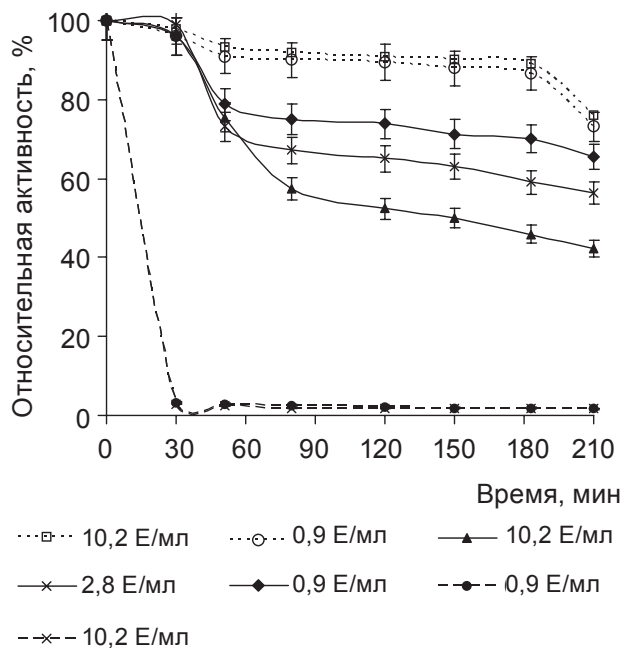


Рис. 1. Кинетические кривые термоинактивации α -галактозидазы *P. canescens* при разных температурах инкубации и при различной концентрации энзима: ----- 55 °С, ————— 60 °С, 65 °С

состояний в процессе инактивации энзима: активный (нативный) энзим (E), дезактивированный энзим, способный к реинактивации (R) и необратимо инактивированный энзим (I). Приняв это положение за основу, мы рассчитали концентрации всех трех форм энзима как функцию от времени инактивации при 60 °С (рис. 3). Через 24 часа количество форм R и E стремится к нулю, в то время как необратимо инактивированный энзим составляет 95–98%. Существование формы R постулируется на основании эффекта обратимости термоинактивации. Учитывая, что E и R заметно отличаются по величине, форме, количеству заряженных ионов, присутствующих в растворе, их можно было бы разделить методами хроматографии или электрофореза. Однако эти методы несравнимы по скорости с процессами трансформации E и R, поэтому такое разделение невозможно осуществить на практике.

Зависимость величины инактивации энзима при различных температурах от его концентрации показана на рис. 1. Следует отметить, что не было существенной разницы в скорости и степени инактивации α -галактозидазы при 55 и 65 °С при различных концентрациях энзима. Однако, при 60 °С и концентрации препарата 10,2 Е/мл термостабильность

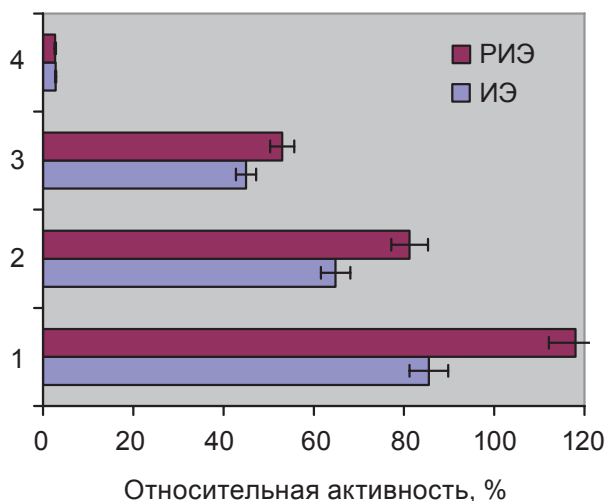


Рис. 2. Активность препаратов α -галактозидазы *P. canescens* после реинактивации при 40 °С, 5 ч. ИЭ – инактивированный фермент, РИЭ – реинактивированный фермент. 1 – 55 °С (концентрация фермента 1,9 Е/мл), 2 – 60 °С (концентрация фермента 13 Е/мл), 3 – 60 °С (концентрация фермента 1,9 Е/мл), 4 – 65 °С (концентрация фермента 1,9 Е/мл)

α -галактозидазы была больше, чем при концентрации 0,9 Е/мл.

Результаты, полученные при 65 °С, отличаются от данных литературы, в соответствии с которыми высокие концентрации фермента стабилизируют молекулы протеина, что позволяет ферменту эффективнее работать при высоких температурах. В тоже время, присутствие

нейтрального протеина (0,5% БСА) при инкубировании α -галактозидазы (60 °С) оказывало значительный защитный эффект (рис. 4).

Исследование термоинактивации α -галактозидазы *P. canescens* в присутствии некоторых углеводов и субстратов показало (табл. 1 и 2), что выраженный защитный эффект в течение 1,5–3 ч оказывали такие олигосахариды как мелибиоза, раффиноза и стахиоза, которые являются субстратами многих α -галактозидаз. Наиболее эффективным был дисахарид – мелибиоза, что, по всей видимости, обусловлено величиной молекулы субстрата. Можно также предположить, что защитный эффект данных субстратов связан с ингибированием процесса образования обратимо инактивированной формы фермента [R].

В присутствии сухой бычьей крови защитный эффект наблюдается только в течение первого часа инкубации при 60 °С, а при 65 °С присутствие бычьей крови только ускоряет термоинактивацию фермента, что, вероятно, связано с наличием гликопротеинов крови, которые денатурируют в большей степени и образуют протеиново-углеводные конгломераты в реакционной смеси.

Также было исследовано влияние глицерола и глутарового альдегида (табл. 3), присутствие которых может защищать молекулу фермента от термоденатурации [9]. Глутаровый альдегид как бифункциональный реагент не оказывает стабилизирующего эффекта. По-видимому, образовавшаяся в результате сшивки продукта жесткая структура препятствует

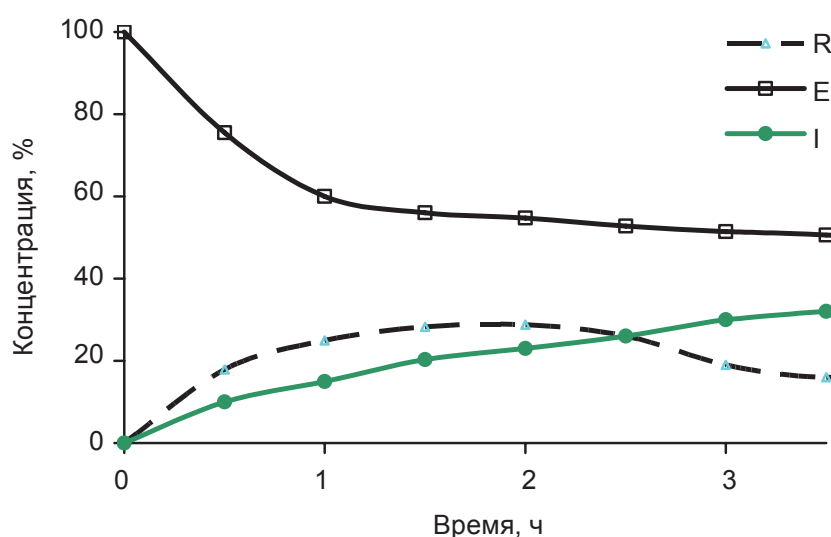


Рис. 3. Зависимость концентрации различных форм фермента от времени. [E] – активная форма фермента; [R] – обратимо инактивированная (переходная) форма фермента; [I] – необратимо инактивированный фермент

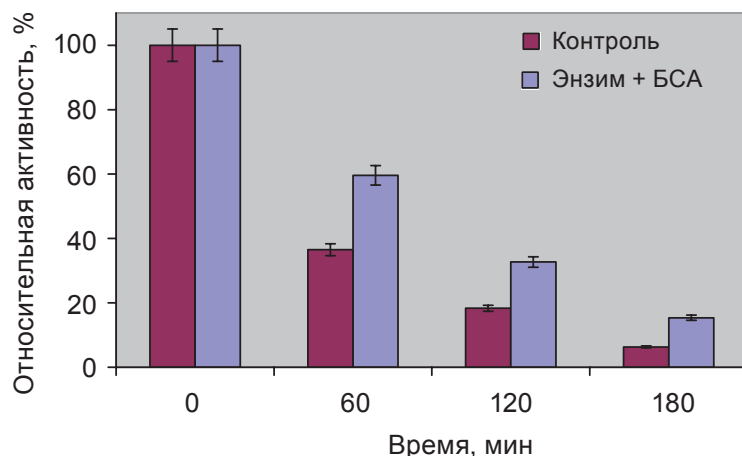


Рис. 4. Зависимость изменения активности α -галактозидазы *P. canescens* от времени при 60 °С с добавлением 0,5% БСА

Таблица 1. Термостабильность α -галактозидазы *P. canescens* при 60 °С

Защитный реагент, 0,5%	Относительная активность, %		
	1 ч	2 ч	3 ч
Сахароза	47,7 ± 2,4	22,7 ± 1,1	6,8 ± 0,3
Галактоза	41,7 ± 2,3	14,6 ± 0,7	2,1 ± 0,1
Глюкоза	42,6 ± 2,3	19,2 ± 0,9	6,0 ± 0,3
Мелибиоза	87,9 ± 4,4	63,6 ± 3,2	39,4 ± 1,9
Раффиноза	51,7 ± 2,7	34,5 ± 1,7	18,90 ± 0,99
Стахиоза	64,6 ± 3,3	52,1 ± 2,6	20,8 ± 1,1
Трегалоza	27,1 ± 1,8	8,0 ± 0,4	2,9 ± 0,1
Мальтоза	43,1 ± 2,3	9,1 ± 0,4	5,9 ± 0,3
Бычья кровь (сух.)	62,9 ± 3,1	17,1 ± 0,8	6,3 ± 0,3
Контроль	36,5 ± 2,1	34,10 ± 1,91	27,2 ± 1,1

Таблица 2. Термостабильность α -галактозидазы *P. canescens* при 65 °С

Защитный реагент, 0,5%	Относительная активность, %		
	30 мин	60 мин	90 мин
Сахароза	40,0 ± 1,9	17,1 ± 0,8	7,46 ± 0,40
Галактоза	49,1 ± 2,3	12,9 ± 1,4	4,1 ± 0,2
Глюкоза	34,6 ± 1,6	14,2 ± 1,5	8,0 ± 0,3
Мелибиоза	60,9 ± 3,0	41,6 ± 1,9	28,8 ± 1,4
Раффиноза	51,1 ± 2,4	26,4 ± 1,3	23,6 ± 1,2
Стахиоза	30,9 ± 1,5	18,3 ± 0,9	11,7 ± 0,6
Контроль	5,90 ± 0,25	1,80 ± 0,06	0,30 ± 0,01

нормальному сворачиванию протеина, что сопровождается еще большей потерей активности. Присутствие в реакционной смеси веществ,

увеличивающих вязкость раствора, может способствовать уменьшению числа столкновений между молекулами энзима и, таким образом,

подавлять инактивацию. И действительно, было отмечено стабилизирующее действие сахарозы, галактозы, глюкозы (табл. 2) и высоких концентраций глицерина (20–40%) (табл. 3).

*Термоинактивация α -галактозидазы *P. canescens* разной степени очистки.* В современной литературе есть данные о том, что термостабильность энзима может зависеть как от степени его очистки, так и от состава питательной среды, в которой выращивается продуцент. Более сложные источники углерода, в случае гликозидаз, позволяют получать более активные и стабильные энзимы. Возможно, от этого зависит степень гликозилирования энзима, что в свою очередь обеспечивает высокую термостабильность. В случае частично очищенных энзимов, углеводы, даже не связанные с ними ковалентными связями, но присутствующие в виде примесей, могут оказывать защитное действие, стабилизируя молекулу энзима. Так, α -рамнозидаза при выращивании продуцента на среде с рамнозой была более стабильной, чем с нарингином [10]. Исследуемая внеклеточная α -галактозидаза получена путем глубинного выращивания культуры микромицета на среде с соевой мукой. Ранее было показано [6], что это высокогликозилированный протеин (14% углеводов), в состав молекулы которого входят манноза, Д-глюкозамин, арабиноза и рамноза. Нами была отмечена зависимость полноты термоинактивации α -галактозидазы от степени очистки энзима (табл. 4). Во всех случаях при 65 °С наблюдается практически полная транс-

формация обратимо инактивируемой формы R в необратимо инактивированную форму I, а при 60 и 55 °С в реакционной среде доминируют формы E и R.

Механизм и кинетика термоинактивации. На кинетических кривых инактивации α -галактозидазы, полученных при 60 и 65 °С, наблюдается излом, который свидетельствует о наличии быстрой (первый участок) и медленной (второй участок) стадии термоинактивации. Во втором случае проходит практически полная и необратимая потеря активности энзима по механизму необратимой денатурации первого порядка. Кинетическая кривая, полученная при 60 °С типична для инактивации олигомерных энзимов, проходящей по диссоциативному механизму. В этом случае в системе одновременно присутствуют три формы энзима, как показано выше, что и определяет наличие излома. В пользу этого предположения свидетельствует положение точки излома и наклон кинетических кривых на вторых участках в зависимости от концентрации энзима. Наклон первых участков от концентрации энзима не зависит. Кинетические константы термоинактивации α -галактозидазы *P. canescens* при 60 °С составляют: $k_{\text{дис}} = 1,7 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, $k_{\text{ас}} = 2,8 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, $k_{\text{ден}} = 3,6 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$, $K_{\text{дисс}} = 2,3 \text{ мкМ}$; при 65 °С — $k_{\text{ден}} = 2,97 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$, $K_{\text{дисс}} = 98 \text{ мкМ}$.

Термоинактивация α -галактозидазы *P. canescens* при 55 °С, по нашим предварительным данным, скорее всего проходит по схеме последовательных превращений перво-

Таблица 3. Влияние присутствия глутарового альдегида и глицерола на термостабильность α -галактозидазы *P. canescens*

Защитный реагент	Т, °С	Относительная активность, %		
		1 ч	2 ч	3 ч
Контроль	60	36,5 ± 2,1	18,30 ± 0,91	6,3 ± 0,3
Глицерол (25%)	60	83,3 ± 4,4	53,9 ± 2,1	66,8 ± 3,3
Глутаровый альдегид (25%)	60	23,6 ± 1,3	7,2 ± 0,4	3,8 ± 0,2
		30 мин	60 мин	90 мин
Контроль	65	5,90 ± 0,25	1,80 ± 0,06	0,30 ± 0,01
Глицерол (5%)	65	6,8 ± 0,4	1,00 ± 0,03	0,30 ± 0,01
Глицерол (10%)	65	12,1 ± 0,5	4,7 ± 0,2	1,9 ± 0,1
Глицерол (20%)	65	23,6 ± 1,0	11,9 ± 0,4	6,4 ± 0,4
Глицерол (25%)	65	47,9 ± 2,7	20,7 ± 0,9	13,6 ± 0,5
Глицерол (30%)	65	42,9 ± 2,4	35,5 ± 1,7	26,9 ± 1,3
Глицерол (40%)	65	45,1 ± 2,3	37,5 ± 1,8	32,5 ± 1,3
Глутаровый альдегид (25%)	65	12,02 ± 0,6	1,44 ± 0,01	0,30 ± 0,01

Таблица 4. Термоинактивация α -галактозидазы различной степени очистки

Образец	Температура	Относительная активность, %		
		1 ч	2 ч	3 ч
Культуральная жидкость	65 °С	10,56	1,76	0,84
	Реинактивация, 40 °С	12,5	2,1	1,3
	55 °С	118	113	103,3
	Реинактивация, 40 °С	102	102,5	101,4
Частично очищенный энзим	65 °С	2,3	1,3	0,9
	Реинактивация, 40 °С	2,2	1,02	1,0
	60 °С	89	56	52
	Реинактивация, 40 °С	98	96,7	96
	55 °С	121	113	87,8
	Реинактивация, 40 °С	121,8	110	105,6
Очищенный энзим	65 °С	1,1	1,21	0,8
	Реинактивация, 40 °С	0,9	0,98	0,5
	60 °С	82,7	71,1	55,4
	Реинактивация, 40 °С	92,2	80,1	66,7
	55 °С	91	87	57,6
	Реинактивация, 40 °С	95,4	90,1	86,5

го порядка, когда стабильные и нестабильные формы энзима имеют примерно одинаковую каталитическую активность. Об этом свидетельствует характер кинетической кривой (рис. 1).

Таким образом, изученная α -галактозидаза *P. canescens* представляет весьма эффективный катализатор, который может найти применение в науке и практике. Высокая специфичность по отношению к α -1,3-связанной галактозе, показанная ранее [6], делает этот энзим ценным инструментом в процессах биотрансформации крови, а высокая активность и стабильность в условиях тепловой инактивации позволяет эффективно использовать его в различных технологических процессах. Полученные результаты могут способствовать выбору стратегии стабилизации олигомерного протеина, включающей подавление первичных обратимых стадий инактивации.

ТЕРМОІНАКТИВАЦІЯ α -ГАЛАКТОЗИДАЗИ *Penicillium canescens*

Н. В. Борзова, Л. Д. Варбанець

Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ;
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Досліджена кінетика та механізм термоінактивациі α -галактозидази *Penicillium canescens* у діапазоні температур 55–65 °С. Запропоновано кінетичну схему термоінактивациі ензиму, що включає оборотну дисоціацію активних гексамерів у мономери, які здатні до асоціації, та необоротну денатурацію мономерів. Розраховані кінетичні константи термоінактивациі ензиму. Вивчено залежність процесу термоінактивациі від ступеня очистки та концентрації ензиму. Показана можливість захисту протеїнової молекули від термоінактивациі у присутності БСА, гліцеролу, мелібіози, рафінози та стахіози.

Ключові слова: α -галактозидаза, *Penicillium canescens*, термоінактивациа, константи термоінактивациі.

**THERMAL INACTIVATION OF
Penicillium canescens α -GALACTOSIDASE**

N. V. Borzova, L. D. Varbanets

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

S u m m a r y

The kinetics and mechanism of thermal inactivation of *Penicillium canescens* α -galactosidase in the temperature range of 55-65 °C have been studied. The kinetic scheme of α -galactosidase thermal inactivation was proposed which included the reversible dissociation of active hexamers into associating monomers and irreversible denaturation of monomers. The kinetic constants of thermal inactivation have been determined. The effect of enzyme concentration and purification efficiency has been investigated. A possibility of defence of protein molecule from thermal inactivation in the presence of BSA, glycerol, melibiose, raffinose and stachyose is shown.

Key words: α -galactosidase, *Penicillium canescens*, thermal inactivation, constants of thermal inactivation.

1. *LeBlanc J. G., Silvestroni A., Connes C. et al.* // Genet. Mol. Res. – 2004. – **3**, N 3. – P. 432–440.
2. *Yoon M. Y., Hwang H. J.* // Food Microbiol. – 2008. – **25**, N 6. – P. 815–823.
3. *Linden J. C.* // Enzyme Microb. Technol. – 1982. – **4**, N 3. – P. 130–136.
4. *Hata D. J., Smith D. S.* // Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. – 2004. – **32**, N 2. – P. 263–274.
5. *Lidove O., Joly D., Barbey F. et al.* // Int. J. Clin. Pract. – 2007. – **61**, N 2. – P. 293–302.
6. *Буглова Т. Т., Маланчук В. М., Захарова И. Я. и др.* // Микробиол. журн. – 1994. – **56**, № 4. – С. 3–11.
7. *McCleary B.* // Methods Enzymol. – 1988. – **160**. – P. 627–632.
8. *Полторак О. М., Чухрай Е. С., Торшин И. Ю.* // Биохимия. – 1998. – **63**, № 3. – С. 360–369.
9. *Тяги Р., Гунта М. Н.* // Биохимия. – 1998. – **63**, № 3. – С. 395–407.
10. *Soria F., Ellenrieder G.* // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2002. – **66**, N 7. – P. 1442–1449.

Получено 11.03.2010