

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.152.32

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ И СПЕЦИФИЧЕСКИХ ХИМИЧЕСКИХ РЕАГЕНТОВ НА АКТИВНОСТЬ α -L-РАМНОЗИДАЗЫ *Eupenicillium erubescens*

© Е. В. ГУДЗЕНКО, Н. В. БОРЗОВА, Л. Д. ВАРБАНЕЦ

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев;
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Исследовано влияние катионов, анионов и специфических химических реагентов: 1-[3-(диметиламино)пропил]-3-этилкарбодимид метиодида, EDTA, о-фенантролина, дитиотреитола, L-цистеина, β -меркаптоэтанола, п-хлормеркурибензоата (п-ХМБ), N-этилмалеимида на активность α -L-рамнозидазы *Eupenicillium erubescens*. Существенное влияние на активность α -L-рамнозидазы *E. erubescens* оказывают ионы Ag^+ и Hg^{2+} , ингибирующие активность энзима на 47–73%. Рамноза в концентрации 1–5 мМ не предохраняет энзим от ингибирующего влияния ионов Ag^+ и Hg^{2+} , в то время как L-цистеин проявляет защитное действие. На основании ингибиторного и кинетического анализа предполагается участие в каталитическом акте α -L-рамнозидазы карбоксильной группы C-терминальной аминокислоты и имидазольной группы гистидина. Поскольку активность α -L-рамнозидазы угнетается п-ХМБ, а такие тиоловые реагенты как дитиотреитол, L-цистеин, β -меркаптоэтанол не снимают его ингибиторное действие, можно предположить, что сульфгидрильные группы принимают участие в катализе, осуществляемом α -L-рамнозидазой *E. erubescens*.

Ключевые слова: α -L-рамнозидаза, *Eupenicillium erubescens*, ионы металлов, специфические химические реагенты.

В последние годы биокаталитические технологии становятся все более востребованными и соответственно постоянно растет количество энзимов, эффективно используемых в различных областях промышленности. Одной из широко изучаемых групп энзимов являются гликозидазы, катализирующие расщепление гликозидных связей в олиго-, полисахаридах и различных гликоконъюгатах. Одним из представителей гликозидаз является α -L-рамнозидаза (α -L-рамнозидрамногидролаза, 3.2.1.40), которая гидролитически отщепляет концевые невосстановленные α -1,2, α -1,4 и α -1,6- связанные остатки L-рамнозы в α -L-рамнозидах.

Ранее [1] в результате скрининга, проведенного среди музейных культур отдела физиологии и систематики микромисетов ИМВ НАН Украины, был отобран перспективный штамм *Eupenicillium erubescens*, изучены его трофические потребности в питательных веществах, подобраны оптимальные условия культивирования [2]. Из культуральной жид-

кости *E. erubescens* выделен и очищен препарат α -L-рамнозидазы, изучены его физико-химические свойства [3].

Вместе с тем, для создания высокоэффективной технологии получения энзимных препаратов необходимы исследования оптимальных параметров α -L-рамнозидазной реакции, механизма действия энзима. В связи с этим целью данной работы было изучение влияния ионов металлов и специфических химических реагентов на активность α -L-рамнозидазы *E. erubescens*.

Материалы и методы

Культуру гриба *E. erubescens* выращивали глубинным способом при температуре 25 °С, на качалках при 220 об./мин на среде Чапека, оптимизированной ранее [2].

Энзимный препарат α -L-рамнозидазы получали из культуральной жидкости продуцента путем осаждения сульфатом аммония (до 90%-го насыщения) с последующей хромато-

графией на заряженных и нейтральных TSK-гелях (DEAE-Toypearl 650s и Toypearl HW-60 «Toya Soda», Япония) соответственно.

Специфическая α -L-рамнозидазная активность препарата составляла 120 Е на 1 мг протеина (содержание протеина – 0,01 мг/мл).

Для определения α -L-рамнозидазной активности использовали синтетический субстрат – *n*-нитрофенил- α -L-рамнопиранозид (*n*-НФР) фирмы ICN Pharmaceuticals (США).

Для определения активности энзима к 0,1 мл его раствора добавляли 0,2 мл 0,1 М фосфатно-цитратного буфера (ФЦБ), рН 5,2 и 0,1 мл 0,01 М раствора субстрата в ФЦБ. Реакционную смесь инкубировали в течение 10 мин при температуре 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 2 мл 1 М раствора бикарбоната натрия. В контроль добавляли те же компоненты, но в обратном порядке. Количество *n*-нитрофенола, отщепившегося от субстрата в результате гидролиза, определяли колориметрическим методом по поглощению при 400 нм [4]. За единицу активности α -L-рамнозидазы (Е) принято количество энзима, которое гидролизует 1 мкмоль нитрофенильного субстрата в минуту в стандартных условиях опыта. Удельную активность рассчитывали как количество единиц активности, отнесенное к 1 мг протеина.

В экспериментах по ингибированию α -L-рамнозидазы использовали ионы металлов в виде сульфатов, а также специфические химические реагенты: этилендиаминтетраацетат (EDTA), *o*-фенантролин, дитиотреитол, L-цистеин, β -меркаптоэтанол, *n*-ХМБ, N-этилмалеимид, 1-[3-(диметиламино)пропил]-3-этилкарбодиимид метиодид (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 10^{-3} М. Инкубацию энзима с реагентом проводили в течение 1 ч при температуре 20 °С. Пробы, отбирали через 15, 30, 45 и 60 мин для определения α -L-рамнозидазной активности. Все исследования проводили в 0,1 М ФЦБ, рН 5,2.

Вопытах по реактивации α -L-рамнозидазы тиоловые реагенты (дитиотреитол, L-цистеин, β -меркаптоэтанол), а также L-рамнозу добавляли к 0,1 мл раствора энзима в конечной концентрации 0,5–5 мМ за 10 мин до или через 30 мин после внесения ингибитора в реакционную среду.

Методом Диксона и Уэбба [5] и по зависимости скорости реакции от рН среды [6] определяли рК диссоциирующих групп, участвующих в гидролизе субстрата.

Теплоту ионизации каталитически активных групп определяли по уравнению Вант-Гоффа:

$$\Delta H = 2,303R(pK_1 - pK_2)/(T_1T_2/(T_2 - T_1)),$$

где ΔH – теплота ионизации каталитически активной группы; R – газовая постоянная, равная 8,36 Дж·моль⁻¹; pK_1 , pK_2 – константы ионизации при температуре T_1 и T_2 соответственно. Величины K_1 и K_2 находили по кривым $V = f(pH)$, определенным в интервале температур 5–40 °С.

Фотоокисление проводили при различных значениях рН и температуры. В качестве источника света были использованы лампы накаливания (200 Вт) с красным светофильтром, находящиеся на расстоянии 15 см от поверхности раствора. В качестве фотосенсибилизатора использовали 5×10^{-6} М метиленовый синий. Контролем служили пробы, содержащие такое же количество фотосенсибилизатора в темноте, а также образцы, которые освещались тем же источником света, но не содержали красителя.

Содержание протеина на всех этапах исследования регистрировали на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 280 нм, его количество определяли методом Lowry et al. [7].

Результаты исследований статистически обрабатывали, используя *t*-критерий Стьюдента [8].

Результаты и обсуждение

Известно [9], что присутствие металлов не является обязательным условием проявления активности ряда гликозидаз, но они могут изменять конформацию молекулы и делать более доступными для субстрата активные центры, при этом может изменяться также ориентация групп, которые находятся на некотором расстоянии от активного центра. Предугадать, какое действие будет оказывать тот или иной металл на активность энзима практически невозможно. Проведенные нами исследования показали, что препарат α -L-рамнозидазы *E. erubescens* устойчив к действию следующих катионов: NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} . Ионы Ba^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} ингибировали активность энзима на 25–35%. Существенное влияние оказывают катионы Ag^+ и Hg^{2+} , которые уменьшают активность энзима на 47–73% (табл. 1). Ранее другими исследователями [10] также было показано ингибирующее действие Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} на актив-

Таблиця 1. Влияние катионов металлов и аммония на активность α -L-рамнозидазы *E. erubescens* ($M \pm m, n = 5$)

| Катион, 10^{-3} М | Активность, % после инкубации с катионами, мин | | | | |
|---------------------|--|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 |
| Контроль | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| NH_4^+ | 97,05 \pm 1,2 | 96,0 \pm 0,9 | 93,4 \pm 0,9 | 90,1 \pm 1,2 | 88,5 \pm 1,4 |
| K^+ | 100,0 \pm 0,1 | 99,8 \pm 0,8 | 90,5 \pm 0,3 | 89,3 \pm 2,6 | 88,5 \pm 1,3 |
| Na^+ | 100,0 \pm 0,1 | 100,0 \pm 0,1 | 100,0 \pm 0,1 | 100,0 \pm 0,1 | 100,0 \pm 0,1 |
| Li^+ | 99,9 \pm 0,9 | 99,9 \pm 1,2 | 99,9 \pm 3,5 | 101,5 \pm 0,3 | 102,0 \pm 0,2 |
| Ag^+ | 80,0 \pm 1,9 | 79,5 \pm 4,0 | 50,9 \pm 5,0 | 28,57 \pm 0,70 | 28,57 \pm 0,7 |
| Cd^{2+} | 76,9 \pm 2,3 | 76,9 \pm 4,0 | 80,2 \pm 3,4 | 79,4 \pm 0,8 | 87,3 \pm 0,6 |
| Ca^{2+} | 100,0 \pm 0,1 | 101,5 \pm 0,7 | 102,8 \pm 1,3 | 103,4 \pm 4,0 | 104,7 \pm 3,4 |
| Mg^{2+} | 95,9 \pm 4,0 | 91,9 \pm 3,1 | 89,5 \pm 3,5 | 88,6 \pm 4,0 | 87,1 \pm 1,9 |
| Hg^{2+} | 89,7 \pm 3,5 | 85,0 \pm 3,0 | 80,1 \pm 3,4 | 55,0 \pm 3,5 | 53,7 \pm 2,3 |
| Ni^{2+} | 85,2 \pm 1,6 | 85,2 \pm 1,9 | 85,2 \pm 1,9 | 85,2 \pm 1,7 | 85,2 \pm 1,9 |
| Mn^{2+} | 89,7 \pm 0,6 | 88,9 \pm 1,6 | 87,5 \pm 3,9 | 87,5 \pm 4,0 | 85,8 \pm 3,7 |
| Zn^{2+} | 73,0 \pm 1,5 | 74,5 \pm 5,0 | 78,2 \pm 5,0 | 78,2 \pm 5,0 | 87,7 \pm 2,0 |
| Co^{2+} | 89,8 \pm 1,9 | 89,8 \pm 0,9 | 89,8 \pm 0,9 | 89,8 \pm 0,9 | 89,8 \pm 0,9 |
| Cu^{2+} | 89,5 \pm 0,5 | 84,6 \pm 4,0 | 83,1 \pm 0,7 | 82,9 \pm 4,0 | 82,0 \pm 1,3 |
| Ba^{2+} | 74,3 \pm 5,0 | 69,2 \pm 3,0 | 64,1 \pm 0,1 | 64,1 \pm 0,2 | 64,1 \pm 0,2 |
| Pb^{2+} | 71,7 \pm 0,7 | 71,7 \pm 0,7 | 71,7 \pm 0,7 | 71,7 \pm 0,7 | 71,7 \pm 1,9 |
| Fe^{2+} | 61,5 \pm 3,8 | 61,5 \pm 4,0 | 64,1 \pm 0,2 | 71,7 \pm 0,9 | 75,6 \pm 2,0 |
| Fe^{3+} | 64,1 \pm 0,2 | 64,1 \pm 3,0 | 69,2 \pm 3,0 | 74,3 \pm 5,0 | 75,6 \pm 1,8 |
| Al^{3+} | 100,0 \pm 0,1 | 110,7 \pm 2,9 | 114,3 \pm 4,0 | 115,6 \pm 3,8 | 118,4 \pm 4,6 |

ность α -L-рамнозидаз *A. nidulans*, *A. aculeatus* [11], *A. niger* [12], *Sphingomonas* sp. R1 [13]. Ионы Ca^{2+} и Al^{3+} незначительно (на 5 и 18% соответственно) повышали активность исследуемой α -L-рамнозидазы *E. erubescens* (табл. 1). Рядом авторов было показано активирующее действие ионов Ca^{2+} на активность α -L-рамнозидаз *A. niger* и *Stagonospora avenae*, а также ионов Zn^{2+} , Mg^{2+} и Co^{2+} на активность α -L-рамнозидазы *A. terreus* [14, 15]. Ранее [16] исследователи при изучении кристаллической структуры α -L-рамнозидазы *Bacillus* sp. GL1 обнаружили в ней ионы Ca^{2+} , которые, однако, не активируют активность энзима. Поскольку ионы Ca^{2+} повышают активность α -L-рамнозидазы *Eupenicillium erubescens* только на 5%, можно предположить, что, как и в α -L-рамнозидазе *Bacillus* sp. GL1, они присутствуют, но не входят в ее каталитический центр.

При изучении влияния различных анионов (табл. 2) на активность α -L-рамнозидазы *E. erubescens* установлено, что большинство из них практически не оказывают существенного

влияния. И только арсенит на 70% ингибирует ее активность, что дает основание предположить о наличии в активном центре или вблизи SH-групп, взаимодействие которых с арсеником приводит к образованию дитиоарсенита. Незначительное активирующее действие карбоната (на 12%) и тетрабората (на 16%) носит, вероятно, неспецифический характер, поскольку не наблюдается увеличения активирования во времени.

Механизм ингибирующего действия ионов металлов на каталитическую активность установить достаточно трудно, поскольку они могут конкурировать с субстратом за место связывания в активном центре, а также способны взаимодействовать с различными группами протеиновой молекулы, находящимися вне активного центра, но влияющими на каталитические функции энзима, т.е. связываться с аллостерическим центром энзима [17]. Известно [18], что ингибирование активности энзима ионами тяжелых металлов может быть следствием образования ими комплексов, в

Таблица 2. Влияние различных анионов на активность α -L-рамнозидазы *E. erubescens* ($M \pm m$, $n=5$)

| Анион, 10^{-3} М | Активность, % после инкубации, мин | | | | |
|---|------------------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 |
| Контроль | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| Cl ⁻ | 100,0 ± 0,3 | 100,0 ± 2,3 | 100,0 ± 0,3 | 100,0 ± 1,3 | 100,0 ± 0,3 |
| I ⁻ | 92,3 ± 0,7 | 92,3 ± 5,0 | 92,3 ± 0,2 | 92,3 ± 3,7 | 92,3 ± 0,7 |
| F ⁻ | 99,9 ± 0,1 | 99,9 ± 0,5 | 99,98 ± 0,30 | 99,6 ± 2,0 | 99,6 ± 0,1 |
| Br ⁻ | 96,9 ± 0,2 | 97,2 ± 4,0 | 97,3 ± 3,5 | 96,5 ± 0,7 | 96,9 ± 0,9 |
| N ₃ ⁻ | 100,0 ± 0,1 | 100,0 ± 0,1 | 100,0 ± 0,1 | 100,0 ± 0,1 | 100,0 ± 0,1 |
| NO ₃ ⁻ | 100,0 ± 0,1 | 102,5 ± 1,7 | 99,9 ± 0,9 | 100,0 ± 0,7 | 100,0 ± 3,0 |
| NO ₂ ⁻ | 98,5 ± 0,5 | 98,5 ± 0,5 | 98,5 ± 0,5 | 98,5 ± 0,5 | 98,5 ± 0,5 |
| H ₂ PO ₄ ⁻ | 107,6 ± 1,6 | 106,0 ± 0,7 | 105,0 ± 3,6 | 104,9 ± 2,1 | 103,8 ± 2,1 |
| S ₂ O ₃ ⁻² | 96,9 ± 5,0 | 97,8 ± 0,8 | 97,8 ± 2,3 | 97,0 ± 0,9 | 96,9 ± 4,0 |
| SO ₄ ⁻² | 92,3 ± 0,7 | 93,5 ± 0,5 | 92,5 ± 0,3 | 92,5 ± 0,3 | 92,5 ± 0,3 |
| AsO ₃ ⁻² | 66,6 ± 0,6 | 66,6 ± 0,6 | 66,6 ± 0,6 | 60,0 ± 0,2 | 26,6 ± 5,0 |
| CO ₃ ⁻² | 100,0 ± 2,0 | 107,6 ± 3,2 | 112,3 ± 4,0 | 112,3 ± 4,0 | 112,3 ± 4,0 |
| B ₄ O ₇ ⁻² | 112,0 ± 0,5 | 115,0 ± 3,6 | 116,0 ± 3,0 | 116,0 ± 3,0 | 116,0 ± 3,0 |
| CH ₃ COO ⁻ | 100,0 ± 0,1 | 100,0 ± 0,1 | 100,0 ± 0,1 | 100,0 ± 0,1 | 100,0 ± 0,1 |
| C ₄ H ₅ O ₆ ⁻ | 99,98 ± 2,00 | 99,9 ± 1,0 | 99,98 ± 2,00 | 99,98 ± 2,00 | 99,98 ± 2,00 |

первую очередь с сульфгидрильными, а также с карбоксильными или имидазольными группами протеина. Для того, чтобы определить какие же именно группы в молекуле энзима были подвергнуты воздействию тяжелых металлов, насколько они ответственны за катализ необходимо провести количественный анализ ингибирования на основе теории Михаэлиса-Ментен, а это возможно только в том случае, когда наблюдаемый ингибиторный эффект носит обратимый характер. Исследуя влияние ингибиторов в динамике, по форме кривых можно установить характер ингибирования. При обратимом характере ингибирования кривые, отражающие зависимость величины активности от времени воздействия ингибитора при фиксированном количестве ингибитора и энзима, через определенный временной интервал выходят на плато, т.е. не происходит увеличения ингибиторного эффекта во времени. Именно такой характер кривых мы наблюдаем при ингибировании α -L-рамнозидазы *E. erubescens* ионами серебра (рис. 1) и ртути (рис. 2), причем отмечено, что степень ингибирования, присущая данной концентрации ингибитора, проявляется в первые 30 мин

инкубации. Обратимый характер ингибирования энзима подтверждается также тем, что диализ препарата α -L-рамнозидазы, ингибированного ионами Ag⁺ и Hg²⁺, против 0,01 М ФЦБ (рН 5,2) в течение одних суток приводит к восстановлению активности практически к исходной.

L-Рамноза, добавленная в реакционную среду (конечная концентрация 0,5–5,0 мМ) до внесения ингибирующего агента (ионы Ag⁺ и Hg²⁺), не оказывает защитный эффект на молекулу энзима (рис. 3, 4). Поскольку, по данным литературы [17], L-рамноза является конкурентным ингибитором α -L-рамнозидазы, можно предположить, что ионы серебра и ртути не взаимодействуют с функционально важными группами (или группой) в активном центре энзима. Аналогичные данные получены ранее [18] для α -L-рамнозидазы *Penicillium commune* 266. Следует отметить, что по отношению к α -L-рамнозидазе *E. erubescens* L-рамноза не только не проявляет защитного эффекта, но в сочетании с сильным ингибитором – ионами Hg²⁺ – увеличивает ее ингибирующий эффект (с 43 до 80%).

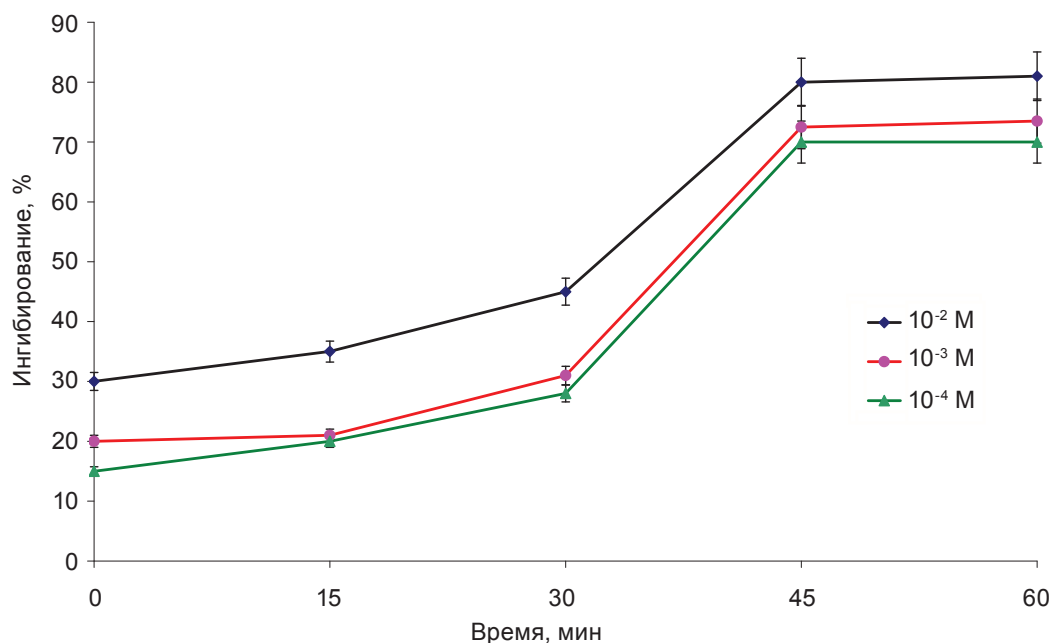


Рис. 1. Ингибирование α -L-рамнозидазы *E. erubescens* ионами серебра в динамике

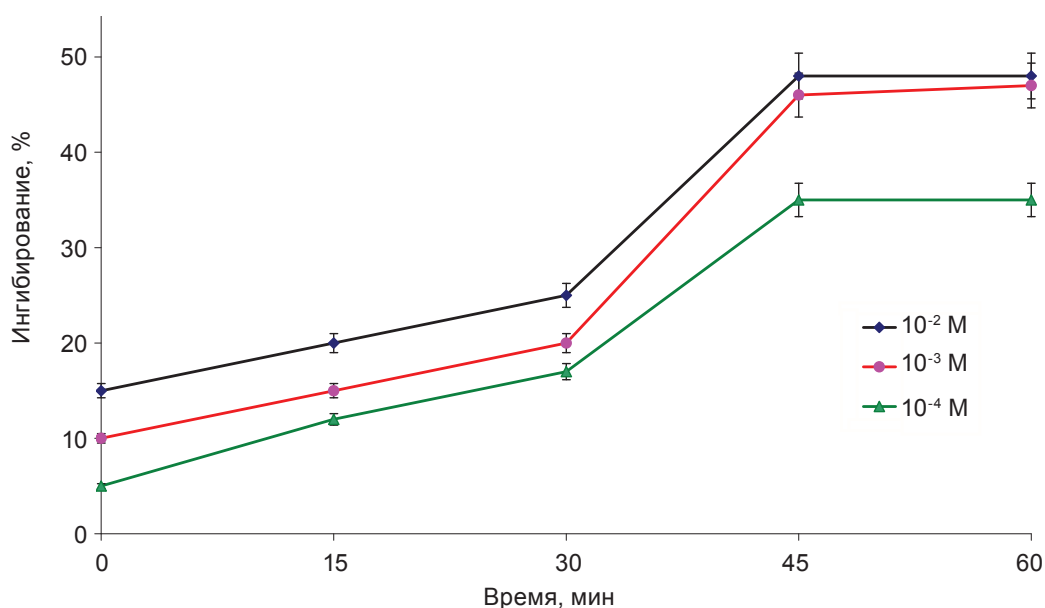


Рис. 2. Ингибирование α -L-рамнозидазы *E. erubescens* ионами ртути в динамике

L-цистеин, добавленный в реакционную смесь в концентрации 0,5–5,0 мМ до взаимодействия Ag^+ с энзимом, снижает на 30% ингибирующее действие ионов металлов (рис. 5, А). L-цистеин, добавленный после внесения ионов серебра в реакционную смесь, защитного действия не оказывает (рис. 5, Б).

Прединкубация с L-цистеином (рис. 6, А) практически полностью защищает α -L-

рамнозидазу от ингибирующего воздействия ионов ртути. Менее выраженную защитную реакцию оказывает L-цистеин, добавленный в реакционную смесь после внесения ионов ртути (рис. 6, Б). Эти данные свидетельствуют о том, что ионы ртути в молекуле энзима взаимодействуют с SH-группами, которые, по-видимому, расположены вне активного центра энзима.

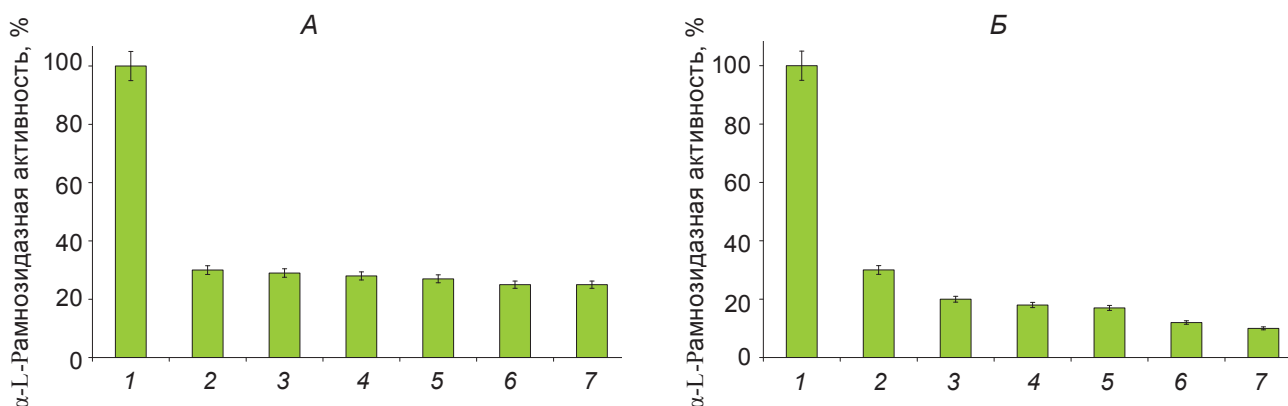


Рис. 3. Влияние L-рамнозы на ингибирование α -L-рамнозидазы *E. erubescens* ионами серебра: 1 – контроль (без ингибитора); 2 – $AgNO_3, 10^{-3} M$; 3 – то же + L-рамноза, 0,5 мМ; 4 – то же + L-рамноза, 1 мМ; 5 – то же + L-рамноза, 2 мМ; 6 – то же + L-рамноза, 4 мМ; то же + L-рамноза, 5 мМ. L-рамноза добавлена до (А) или после (Б) обработки α -L-рамнозидазы ионами серебра

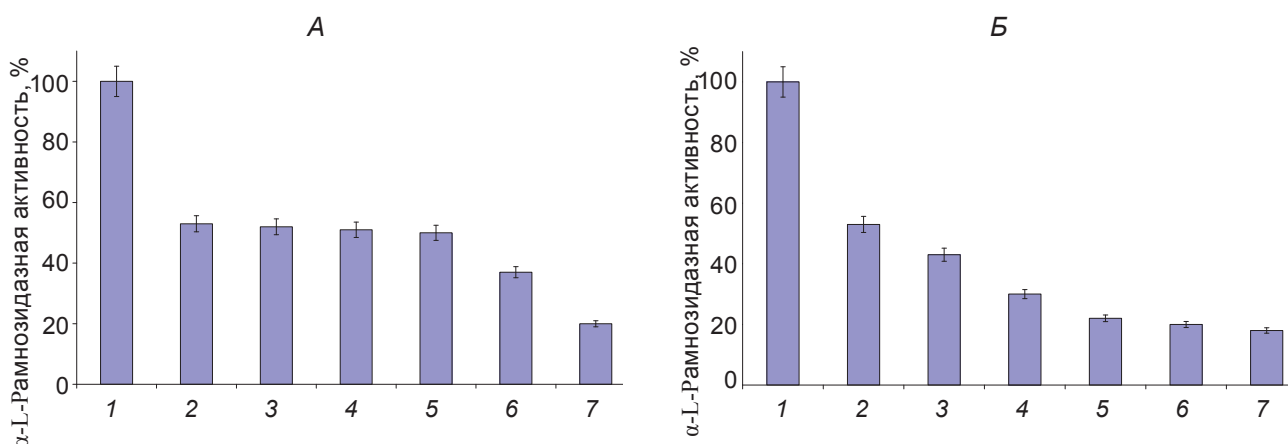


Рис. 4. Влияние L-рамнозы на ингибирование α -L-рамнозидазы *E. erubescens* ионами ртути: 1 – контроль (без ингибитора); 2 – $HgNO_3, 10^{-3} M$; 3 – то же + L-рамноза, 0,5 мМ; 4 – то же + L-рамноза, 1 мМ; 5 – то же + L-рамноза, 2 мМ; 6 – то же + L-рамноза, 4 мМ; то же + L-рамноза, 5 мМ. L-рамноза добавлена до (А) или после (Б) обработки α -L-рамнозидазы ионами ртути

Одним из подходов к изучению механизма действия энзимов является исследование влияния специфических химических реагентов на их активность. Нами были использованы (табл. 3):

- 1) хелатирующие реагенты – EDTA, о-фенантролин;
- 2) реагенты на дисульфидные связи – дитиотреитол, L-цистеин, β -меркаптоэтанол;
- 3) реагенты на SH-группы – *n*-хлормеркурибензоат, N-этилмалеимид;
- 4) реагенты на карбоксильные группы – 1-[3-(диметиламино) пропил]-3-этилкарбодиимид метиодид.

Хелатирующие агенты (EDTA, о-фенантролин) в концентрации $10^{-3} M$ снижают активность α -L-рамнозидазы *E. erubescens*

(табл. 3). Это свидетельствует о том, что в катализе, осуществляемом α -L-рамнозидазой, участвуют функциональные группы, содержащие атомы металлов. На основании этих данных, а также данных о влиянии ионов металлов можно предположить, что исследуемая α -L-рамнозидаза является металлозависимым энзимом. Аналогичные данные получены для *Penicillium ulaiense* [9].

Реагенты, восстанавливающие дисульфидные связи, – дитиотреитол, L-цистеин, β -меркаптоэтанол практически не влияют на активность α -L-рамнозидазы *E. erubescens* (табл. 3), что дает возможность предположить отсутствие в ее молекуле дисульфидных связей.

Мощные тиоловые ингибиторы *n*-ХМБ и N-этилмалеимид на 60–70% инактивиру-

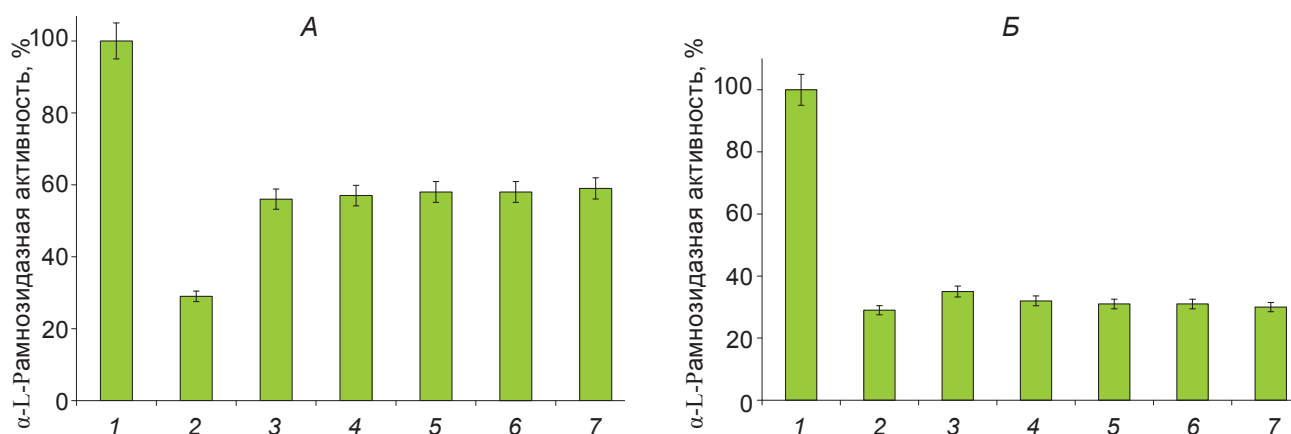


Рис. 5. Влияние L-цистеина на ингибирование α -L-рамнозидазы *E. erubescens* ионами серебра. 1 – контроль (без ингибитора); 2 – AgNO_3 , $1 \cdot 10^{-3}$ M; 3 – то же + L-цистеин, 0,5 мМ; 4 – то же + L-цистеин, 1 мМ; 5 – то же + L-цистеин, 2 мМ; 6 – то же + L-цистеин, 4 мМ; 7 – то же + L-цистеин, 5 мМ. Цистеин добавлен до (А) или после (Б) обработки α -L-рамнозидазы ионами серебра

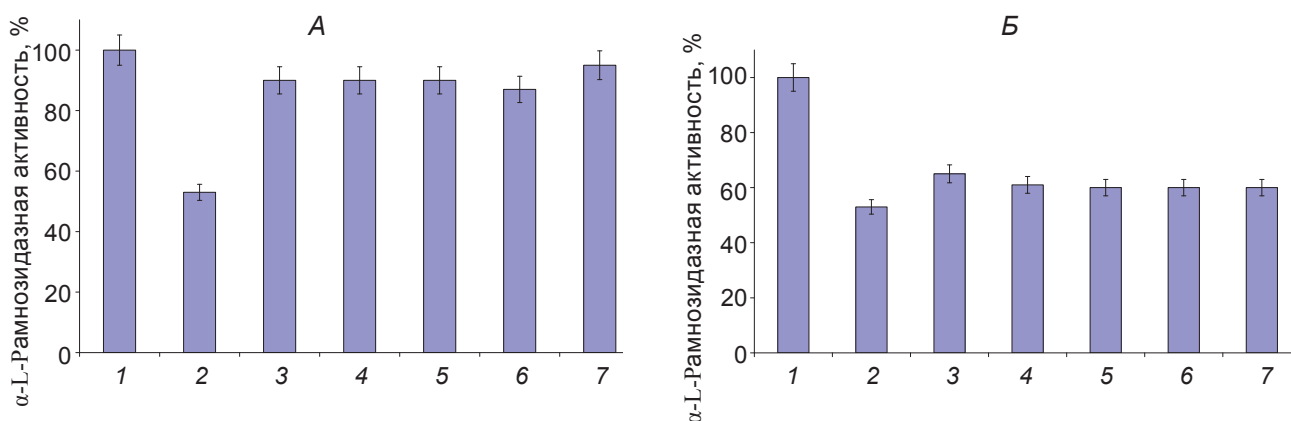


Рис. 6. Влияние L-цистеина на ингибирование α -L-рамнозидазы *E. erubescens* ионами ртути. 1 – контроль (без ингибитора); 2 – HgNO_3 , 10^{-3} M; 3 – то же + L-цистеин, 0,5 мМ; 4 – то же + L-цистеин, 1 мМ; 5 – то же + L-цистеин, 2 мМ; 6 – то же + L-цистеин, 4 мМ; 7 – то же + L-цистеин, 5 мМ. Цистеин добавлен до (А) или после (Б) обработки α -L-рамнозидазы ионами ртути

ют α -L-рамнозидазу в концентрации 10^{-3} M (табл. 3). Поскольку ингибиторный эффект *n*-ХМБ не снимается при воздействии таких реагентов, как дитиотреитол, L-цистеин и β -меркаптоэтанол (рис. 7), можно предположить, что в катализе, осуществляемом α -L-рамнозидазой *E. erubescens*, принимают участие сульфгидрильные группы.

В связи с тем, что 1-[3-(диметиламино)пропил]-3-этилкарбодимид метиодид, модифицирующий карбоксильные группы аминокислот ингибирует активность α -L-рамнозидазы на 50% (табл. 3), можно предположить, что в молекуле α -L-рамнозидазы присутствуют функционально активные карбоксильные группы.

Одним из подходов при изучении каталитически активных групп энзимов является их идентификация по кривым зависимости активности от значений pH. Для исследованной нами α -L-рамнозидазы профиль кривой активности – pH, $v = f(\text{pH})$ имеет колокообразную форму (рис. 8). Восходящая («кислая») и нисходящая («щелочная») ветви кривой свидетельствуют о том, что в элементарном акте разрыва гликозидной связи принимают участие две функциональные группы. Форма обеих ветвей кривой характерна для кривых диссоциации ионных групп аминокислот. Ветви кривой описываются уравнением:

$$\text{для восходящей ветки} - V = V_{\text{max}} / (1 + 10^{\text{pK}_b - \text{pH}}) \quad (1)$$

Таблица 3. Влияние химических реагентов на активность α -L-рамнозидазы *E. erubescens* ($M \pm m$, $n = 5$)

| Концентрация реагента, 10^{-3} М | Активность, % при добавлении ингибиторов, мин | | | | |
|---|---|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 |
| Контроль | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| EDTA | 100,0 | 73,0 \pm 0,3 | 71,2 \pm 1,4 | 64,3 \pm 2,8 | 30,5 \pm 1,7 |
| о-Фенантролин | 100,0 | 100,0 | 65,7 \pm 1,7 | 53,1 \pm 0,4 | 42,9 \pm 1,4 |
| Дитиотреитол | 93,3 \pm 3,3 | 93,0 \pm 0,6 | 93,1 \pm 1,8 | 95,5 \pm 3,5 | 93,5 \pm 5,0 |
| L-Цистеин | 96,6 \pm 0,7 | 93,3 \pm 1,3 | 92,5 \pm 5,0 | 93,5 \pm 3,2 | 93,0 \pm 5,0 |
| β -Меркаптоэтанол | 100,0 | 96,2 \pm 3,7 | 96,5 \pm 3,2 | 96,7 \pm 3,8 | 96,6 \pm 2,6 |
| <i>n</i> -Хлормеркурибензоат | 100,0 | 100,0 | 66,4 \pm 0,6 | 50,2 \pm 1,2 | 40,1 \pm 2,0 |
| N-Этилмалеимид | 80,0 \pm 3,0 | 60,0 \pm 5,0 | 50,0 \pm 5,0 | 30,0 \pm 0,1 | 30,0 \pm 0,1 |
| 1-[3-(Диметиламино)пропил]-3-этилкарбодиимид метиодид | 100,0 \pm 0,1 | 58 \pm 3,0 | 55,0 \pm 2,0 | 55,0 \pm 2,0 | 50,0 \pm 5,0 |

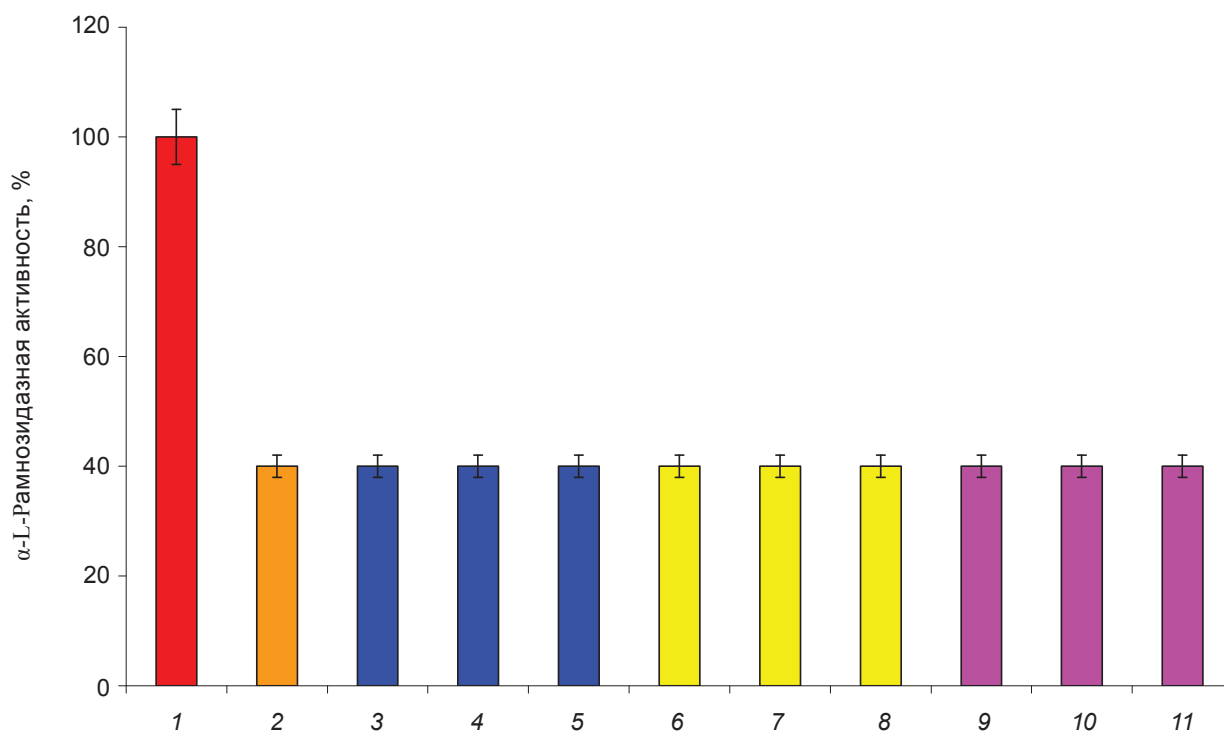


Рис. 7. Реактивация тиоловыми реагентами α -L-рамнозидазы *E. erubescens*, обработанной *n*-ХМБ: 1 – контроль (без ингибитора); 2 – 10^{-3} М *n*-ХМБ; 3 – 10^{-3} М *n*-ХМБ + 10^{-3} М дитиотреитол; 4 – 10^{-3} М *n*-ХМБ + $2 \cdot 10^{-3}$ М дитиотреитол; 5 – 10^{-3} М *n*-ХМБ + $4 \cdot 10^{-3}$ М дитиотреитол; 6 – 10^{-3} М *n*-ХМБ + 10^{-3} М L-цистеин; 7 – 10^{-3} М *n*-ХМБ + $2 \cdot 10^{-3}$ М L-цистеин; 8 – 10^{-3} М *n*-ХМБ + $4 \cdot 10^{-3}$ М L-цистеин; 9 – 10^{-3} М *n*-ХМБ + 10^{-3} М β -меркаптоэтанол; 10 – 10^{-3} М *n*-ХМБ + $2 \cdot 10^{-3}$ М β -меркаптоэтанол; 11 – 10^{-3} М *n*-ХМБ + $4 \cdot 10^{-3}$ М β -меркаптоэтанол

и для нисходящей –

$$V = V_{\max} / (1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}), \quad (2)$$

где V – активность энзима в условиях полного насыщения субстратом; V_{\max} – та же активность

в условиях оптимального значения pH ($\text{pH}_{\text{оп}}$); K_a и K_b – константы диссоциации каталитически активных групп энзима. Отсюда вытекает, что $\text{pH} = \text{pK}_b$ или при $\text{pH} = \text{pK}_a$ $V = V_{\max} / 2$, то есть при скорости гидролиза субстрата,

равняющаяся половине максимальной, константы ионизации каталитически активной группы энзима численно равны концентрации H^+ в среде. Исходя из изложенных теоретических предпосылок, рассчитаны величины pK_b и pK_a (3,0 и 6,0 соответственно) групп, принимающих участие в акте катализа, осуществляемого α -L-рамнозидазой (рис. 8). Эти значения соответствуют карбоксильной и имидазольной группам протеинов. Установленные этим методом величины pK_b и pK_a близки к значениям pK , найденным по методу Диксона и Уэбба [5], и дают основание считать, что имеет место ионизация каталитически активных групп – карбоксильной и имидазольной.

Вторым важным критерием, подтвердившим наличие в каталитическом центре α -L-рамнозидазы карбоксильной и имидазольной групп, является определение теплоты ионизации каталитически активных групп α -L-рамнозидазы. Рассчитанные по уравнению Вант-Гоффа [5] величины теплоты ионизации ΔH для pK_b и pK_a составляют 6,9 и 31,4 кДж/моль соответственно. Это может свидетельствовать о том, что в расщеплении гликозидной связи α -L-рамнозидазой *E. erubescens* принимают участие карбоксильная и имидазольная группы.

Специфической реакцией на имидазольную группу гистидина является ее фотоокисление в присутствии метиленового синего, играющего роль фотосенсибилизатора. Фотоокисление приводит к разрыву гетероцикла имидазола и к инактивации энзима. Исследования по фотоокислению проводили в интервале pH 3,0–6,0 при температуре 20–50 °C в условиях, при которых энзим сам по себе значительно не снижает активности. Было показано, что в условиях эксперимента препарат подвергается интенсивной фотоинактивации (рис. 9). Скорость фотоокисления может быть описана уравнением:

$$k = k_0 / (1 + 10^{pH - pK}), \quad (3)$$

отсюда вытекает, что при $pH = pK_a$ $k = k_0/2$.

Кривая $k = f(pH)$, которая описывается уравнением (3), в интервале pH 7,0–8,0 выходит на плато, отвечающее k_0 (рис. 10). Точка пересечения прямой, проведенной параллельно к оси абсцисс на расстоянии $k_0/2$, отвечает pK 6,0, что свидетельствует о фотоокислении имидазольной группы гистидина. С увеличением температуры величина pK_a также возрастает. Воспользовавшись формулой Вант-Гоффа, мы рассчитали теплоту ионизации этой

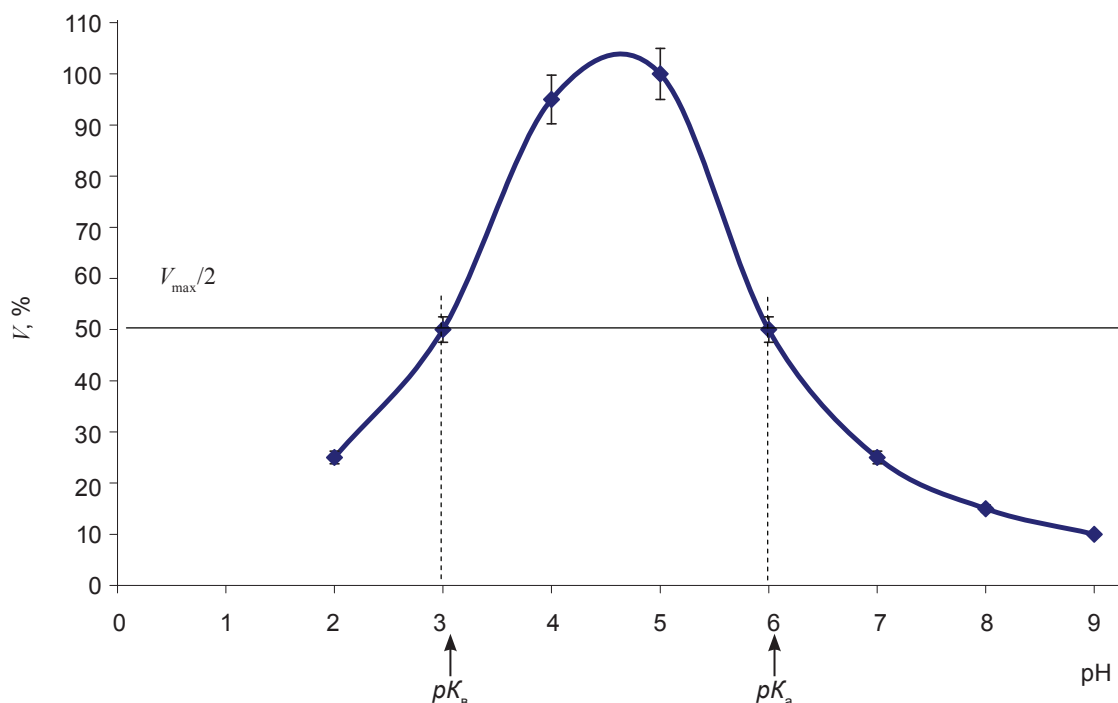


Рис. 8. Влияние pH на активность α -L-рамнозидазы *E. erubescens*. Начальная скорость реакции – V ; константа ионизации активной группы каталитического центра энзима для восходящей ветки кривой – pK_b ; константа ионизации активной группы каталитического центра энзима для нисходящей ветки кривой – pK_a

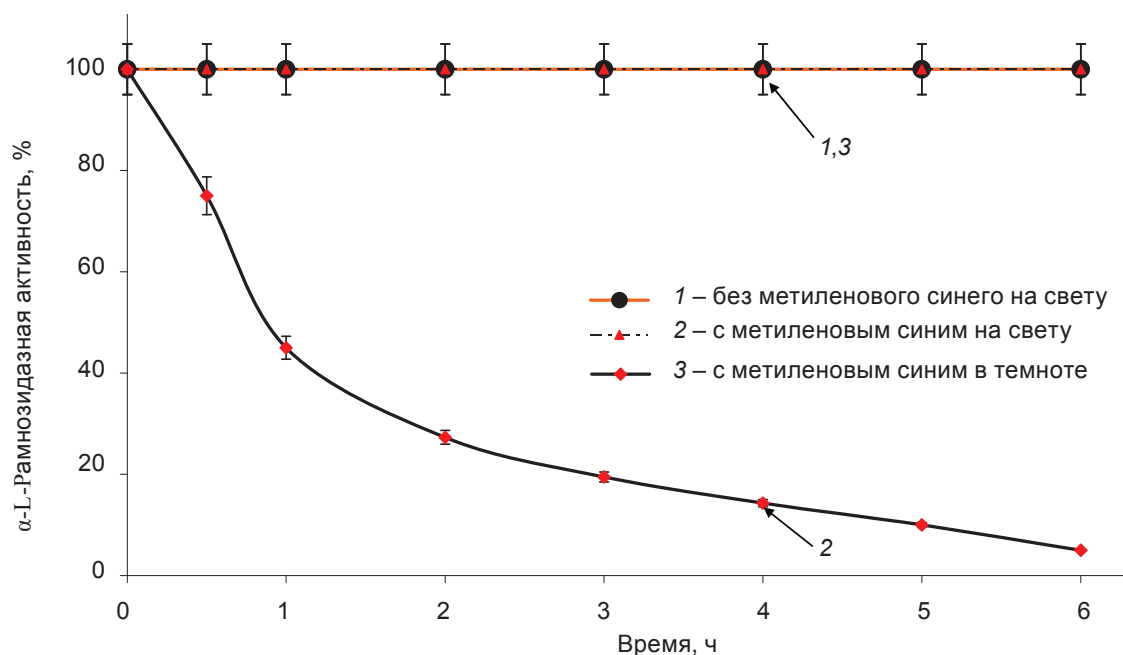


Рис. 9. Кинетика инактивации α -L-рамнозидазы *E. erubescens* в процессе фотоокисления, pH 5,0

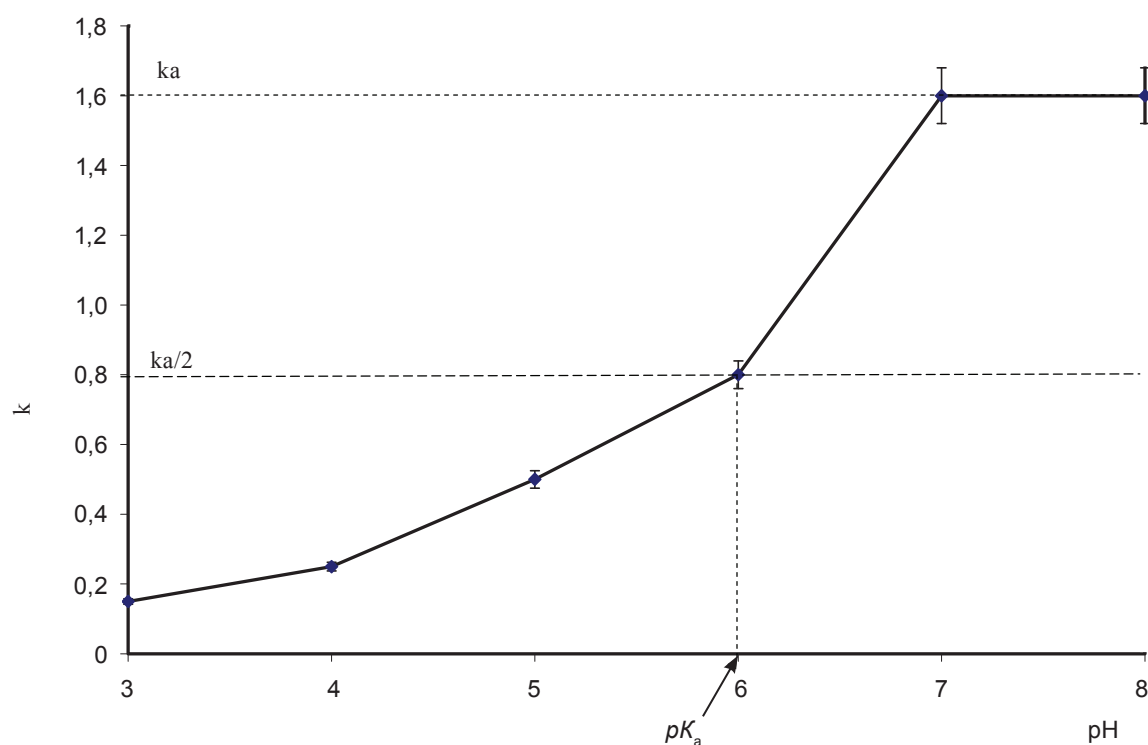


Рис. 10. Зависимость $k = f(pH)$ от фотоокисления препарата *E. erubescens* при 20 °С

группы, которая составляет 31,0 кДж/моль и соответствует теплоте ионизации имидазольной группы.

Таким образом, найденные нами величины теплоты ионизации и результаты опытов

по изучению фотоокисления дают основание считать, что каталитически активными группами α -L-рамнозидазы *E. erubescens*, являются карбоксильная группа С-концевой аминокислоты, а также имидазольная группа гистидина.

Конкретных сведений о механизме действия α -L-рамнозидаз очень мало, поскольку отсутствуют данные по химии и кинетике большинства выделенных из различных источников энзимов. Хотя, по аналогии с другими гликозидазами, можно предположить, что имеет место расщепление связей между атомами углерода рамнозы и кислорода субстратов. Так, установлено, что разрыв связи происходит в направлении атома кислорода, с которым связан нередуцирующий остаток олиго- и полисахарида, и к которому гликозидаза проявляет наибольшую специфичность. Известно, что α -L-рамнозидазы в субстратах действуют на C_1-O или $O-C_n$, где $n = 2, 4, 6$ [19].

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что α -L-рамнозидаза *E. erubescens* является металлотависимым энзимом, в активном центре которого находятся группы, соответствующие имидазольной группе гистидина, а также карбоксильные группы C-терминальной аминокислоты. В катализе, осуществляемом α -L-рамнозидазой *E. erubescens* принимают участие сульфгидрильные группы.

*Автори виражають благодарність співробітникам відділу фізіології та систематики мікроміцетів ІМВ НАН України канд. біол. наук, ст. н. с. Курченко І. Н., докт. біол. наук, проф. Жданової Н. Н. за любезно предоставленню культуру *Eupenicillium erubescens*.*

ВПЛИВ ІОНІВ МЕТАЛІВ І СПЕЦИФІЧНИХ ХІМІЧНИХ РЕАГЕНТІВ НА АКТИВНІСТЬ α -L-РАМНОЗИДАЗИ *Eupenicillium erubescens*

*О. В. Гудзенко, Н. В. Борзова,
Л. Д. Варбанець*

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

Досліджено вплив катіонів, аніонів і специфічних хімічних реагентів: 1-[3-(диметиламіно)пропіл]-3-етилкарбодіїмід метіодиду, EDTA, *o*-фенантроліну, дитіотреїтолу, L-цистеїну, β -меркаптоетанолу, *n*-ХМБ, N-етилмалеїмїду на активність α -L-рамнозидази *Eupenicillium erubescens*. Істотний вплив на активність α -L-рамнозидази *E. erubescens* виявляють іони Ag^+ і Hg^{2+} , які інгібують активність ензиму на 47–73%. Рам-

ноза в концентрації 1–5 мМ не захищає ензим від негативної дії іонів Ag^+ і Hg^{2+} , в той час як L-цистеїн виявляє захисну дію. На основі інгібиторного і кінетичного аналізу припускається участь в каталітичному акті карбоксильної групи C-термінальної амінокислоти та імідазольної групи гістидину. Оскільки активність α -L-рамнозидази пригнічується *n*-ХМБ, а такі тіолові реагенти як дитіотреїтол, L-цистеїн, β -меркаптоетанол не знімають його інгібиторної дії, це може бути обумовлене тим, що сульфгидрильні групи беруть участь у каталізі, який здійснюється α -L-рамнозидазою *E. erubescens*.

Ключові слова: α -L-рамнозидаза, *Eupenicillium erubescens*, іони металів, специфічні хімічні реагенти.

INFLUENCE OF METAL IONS AND SPECIFIC CHEMICAL REAGENTS ON ACTIVITY OF α -L-RHAMNOSIDASE OF *Eupenicillium erubescens*

*O. V. Gudzenko, N. V. Borzova,
L. D. Varbanets*

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

Summary

The effect of cations, anions and specific chemical reagents: 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide, EDTA, *o*-phenanthroline, dithiotreitol, L-cysteine, β -mercaptoethanol, *p*-chlormercurybenzoate (*p*-ChMB), N-ethylmaleimide on the activity of α -L-rhamnosidase of *Eupenicillium erubescens* has been investigated. The essential role of Ag^+ and Hg^{2+} which inhibit the α -L-rhamnosidase activity by 47–73% has been shown. Whereas L-cysteine exhibits the protective effect, rhamnose in concentration of 1–5 mM does not protect the enzyme from negative effect of Ag^+ and Hg^{2+} . Basing on the inhibitory and kinetic analysis it was supposed that the carboxyl group of C-terminal aminoacid and imidazole group of histidine take part in the catalytic action of α -L-rhamnosidase. It was assumed that sulphhydryl groups took part in catalysis, carried out by α -L-rhamnosidase of *E. erubescens*, since the activity of α -L-rhamnosidase inhibited by *p*-ChMB and thiol reagents such as dithiothreitol, L-cysteine, β -mercaptoethanol did not remove its inhibitory action.

Key words: α -L-rhamnosidase, *Eupenicillium erubescens*, metal ions, specific chemical reagents.

1. Рзаєва О. М., Борзова Н. В., Варбанець Л. Д. та ін. // Мікробіол. журн. – 2005. – 67, № 5. – С. 19–27.
2. Гудзенко О. В., Борзова Н. В., Варбанець Л. Д. // Там само. – 2011. – 73, № 3. – С. 46–53.
3. Гудзенко О. В., Варбанець Л. Д. // Там само. – 2012. – 73, № 2. – С. 14–21.
4. *Carbohydrate analysis* / Ed. M. E. Chaplin, J. E. Kennedy. – Oxford; Washington: IRL Press. – 1986. – 228 p.
5. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. – М.: Мир, 1982. – 816 с.
6. Курганов Б. И., Петушкова Е. В. // Биохимия. – 1992. – 57, вып. 3. – С. 348–361.
7. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. C. // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, N 1. – P. 265–275.
8. Лакин Г. Ф. Биометрия. – М.: Высшая шк., 1990. – 352с.
9. Варбанець Л. Д., Борзова Н. В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. – К.: Наук. думка, 2010. – 437 с.
10. Dowzer M., Kelly J. M. // Curr. Genet. – 1989. – 15, N 6. – P. 457–459.
11. Manzanares P., Orejas M., Ibanez E. // Lett. Appl. Microbiol. – 2000. – 31. – P. 198–202.
12. Manzanares P., de Graaf L. H., Visser I. // FEMS Microbiol. Lett. – 1997. – 157, N 2. – P. 279–283.
13. Hashimoto W., Murata K. // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1998. – 62, N 6. – P. 1068–1074.
14. Morrissey I. P., Wubben I. P., Osbourn A. E. // Mol. Plant Microbe Interact. – 2000. – 13, N 10. – P. 1041–1052.
15. Elinbaum S., Ferreyra H., Ellenrieder G., Guevas C. // Lett. Appl. Microbiol. – 2002. – 34, N 1. – P. 67–71.
16. Cui Z., Maruyama Y., Mikami B. et al. // J. Mol. Biol. – 2007. – 374, N 2. – P. 384–396.
17. Медянцева Э. П., Вертлиб М. Г., Будников Г. К. // Успехи химии. – 1998. – 67, № 3. – С. 252–260.
18. Виноградова Р. П. Молекулярные основы действия ферментов. – К.: Вища шк., 1978. – 279 с.
19. Рзаєва О. М., Борзова Н. В., Варбанець Л. Д. // Укр. біохім. журн. – 2008. – 80, № 6. – С. 42–51.

Получено 16.11.2011