

9. D'Amico S., Collins T., Marx J.C., Feller G., Gerday C. Psychrophilic microorganisms: challenges for life // EMBO Rep. – 2006. – 7, N 4. – P. 385–389.
10. Casanueva A., Tuffin M., Cary C., Cowan D.A. Molecular adaptations to psychrophily: the impact of 'omic' technologies // Trends Microbiol. – 2010. – 18, N 8. – P. 374–381.
11. Romanovskaya V.A., Rokitko P.V., Tashirev O.B., Shilin S.O., Chernaya N.A. Psychrophilic methylotrophic bacteria in Antarctic region biotopes // Ukrainian Antarctic Journal (ISSN 1727-7485). – 2006, N 4–5. – С. 241–245.
12. Siddiqui K.S., Poljak A., Guilhaus M., De Francisci D., Curmi P.M., Feller G., D'Amico S., Gerday C., Uversky V.N., Cavicchioli R. Role of lysine versus arginine in enzyme cold-adaptation: modifying lysine to homo-arginine stabilizes the cold-adapted alpha-amylase from *Pseudoalteromonas haloplanktis* // Proteins. – 2006. – 64, N 2. – P. 486–501.
13. Sonan G.K., Receveur-Brechot V., Duez C., Aghajari N., Czjzek M., Haser R., Gerday C. The linker region plays a key role in the adaptation to cold of the cellulase from an Antarctic bacterium // Biochem J. – 2007. – 407, N 2. – P. 293–302.
14. Steven B., Briggs G., McKay C.P., Pollard W.H., Greer C.W., Whyte L.G. Characterization of the microbial diversity in a permafrost sample from the Canadian high Arctic using culture-dependent and culture-independent methods // FEMS Microbiol. Ecol. – 2007. – 59, N 2. – P. 513–523.
15. Wilson S.L., Walker V.K. Selection of low-temperature resistance in bacteria and potential applications // Environ. Technol. – 2010. – 31, N 8-9. – P. 943–956.

Робота проводилась при піддержке Національного антарктичного наукового центру МОН України.

Отримано 17.05.2011

УДК 577.152.32

О.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанець

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, ДОЗ680, Україна*

ДОСЛІДЖЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ГРУП α -L-РАМНОЗИДАЗИ *CRYPTOCOCCUS ALBIDUS*

*Дослідження впливу катіонів, аніонів і специфічних хімічних реагентів: 1-[3-(диметиламіно)пропіл]-3-етилкарбодимід метиодиду, ЕДТА, о-фенантроліну, дитіотреїтолу, L-цистеїну, β -меркаптоетанолу, n-хлормеркурібензоату (n-ХМБ), N-етилмалейміду на активність α -L-рамнозидази *Cryptococcus albidus* свідчить, що суттєвий вплив мають іони Ag^+ , які інгібують активність ензиму на 72,5 %. Рамноза в концентрації 1-5 мМ захищає ензим від негативної дії іонів Ag^+ . На основі інгібіторного та кінетичного аналізу припускається участь у каталітичному акті карбоксильної групи C-термінальної амінокислоти та імідазольної групи гістидину.*

*Ключові слова: α -L-рамнозидаза, *Cryptococcus albidus*, іони металів, специфічні хімічні реагенти, функціональні групи.*

Останнім часом ферменти мікробного походження набувають все більшого значення в різних областях харчової, фармацевтичної та хімічної промисловості. Особливий інтерес у дослідників викликають глікозидази, ферменти класу гідролаз (О-глікозид-гідролази), які здатні каталізувати гідроліз О-глікозидних зв'язків у глікозидах, оліго-, полісахаридах, гліколіпідах та інших глікокон'югатах. Одним із таких ензимів є α -L-рамнозидаза (α -L-рамнозид-рамногідролаза – К.Ф. 3.2.1.40), яка гідролітично відщеплює кінцеві невідновлені α -1,2, α -1,4 і α -1,6 зв'язані залишки L-рамнози в природних продуктах, таких як нарингін, рутин, кверцитрин, гесперидин та інших рамнозівмістних глікозидах [1]. Здатність продукувати α -L-рамнозидази зустрічається серед мікроорганізмів різних таксономічних груп – бактерій, мікроміцетів, але відомий лише один дріжджовий продуцент цього ензиму – *Pichia angusta* X349 [22]. На відміну від більшості α -L-рамнозидаз ензим, який синтезує даний штам дріжджів, є внутрішньоклітинним, тому для його виділення необхідно руйнування клітини.

© О.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанець, 2012

Раніше [11] в результаті скринінгу, проведеного серед музейних культур відділу фізіології промислових мікроорганізмів ІМВ НАН України, відібраний перспективний штам *Cryptococcus albidus*, вивчені його трофічні особливості та підібрані оптимальні умови культивування [3]. З супернатанту культуральної рідини *C. albidus* виділено і очищено препарат α -L-рамнозидази, вивчено його фізико-хімічні властивості [4]. Разом із тим, для створення високоефективної технології отримання ензимних препаратів необхідне дослідження оптимальних параметрів L-рамнозидазної реакції, а також механізму дії ензиму. У зв'язку з цим метою нашої роботи було за допомогою іонів металів та специфічних хімічних реагентів дослідити функціональні групи α -L-рамнозидази *C. albidus*, відповідальні за протікання каталітичного процесу.

Матеріали і методи. Культуру дріжджів *C. albidus* вирощували глибинним способом впродовж чотирьох діб при температурі 28 °С, на качалках при 220 об/хв на середовищі наступного складу, г/л: рамноза – 1, пептон – 5, дріжджовий екстракт – 3, мальтекстракт – 3, рН- 6, оптимізованому раніше [3].

Ензимний препарат α -L-рамнозидази виділяли з культуральних фільтратів продуцента шляхом осадження сульфатом амонію (до 90 % насичення) з наступною хроматографією на заряджених і нейтральних TSK-гелях (DEAE-Toyopearl 650s і Toyopearl HW-60 «Toya Soda» Японія, відповідно).

Специфічна α -L-рамнозидазна активність препарату складала 12 од./мг білка (вміст білка – 0,01 мг/мл).

α -L-рамнозидазну активність визначали методом Davis [7], використовуючи як субстрат нарингін. За одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, яка гідролізує в умовах досліду 1 мкмоль субстрату за хв. Реакційна суміш містила 0,1 мл розчину ензиму в 0,1 М фосфат-цитратному буфері (ФЦБ), рН 5,2, 0,1 мл 2,5 мМ розчину субстрату. Суміш інкубували протягом 30 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням 3 мл 4 М розчину NaOH. Через 30 хв вимірювали інтенсивність забарвлення реакційної суміші при довжині хвилі 310 нм на спектрофотометрі СФ-26 (ЛОМО, СРСР).

В дослідах щодо інгібування α -L-рамнозидази використовували іони металів у вигляді сульфатів, а також наступні специфічні хімічні реагенти: етилендіамінтетраацетат (ЕДТА), *o*-фенантролін, дитіотреїтол, L-цистеїн, β -меркаптоетанол, *n*-хлормеркурібензоат (*n*-ХМБ), N-етилmaleїмід, 1-[3-(диметиламіно)пропіл]-3-етилкарбодимід метіодид («Sigma-Aldrich», США) в кінцевій концентрації 10⁻³ М. Інкубацію ензиму з реагентом проводили протягом 1 год при температурі 20 °С. Для визначення α -L-рамнозидазної активності проби відбирали через 15, 30, 45 і 60 хв. Всі дослідження проводили в 0,1 М ФЦБ рН 5,2.

В дослідах з реактивації α -L-рамнозидази L-рамнозу додавали до 0,1 мл розчину ензиму в кінцевій концентрації 0,5-5 мМ за 10 хв до або через 30 хв після внесення інгібітора в реакційне середовище.

рК Дисоціюючих груп, що беруть участь у гідролізі субстрату, визначали методом Діксона і Уеба [5] і залежно від швидкості реакції від рН середовища [7].

Теплоту іонізації каталітично активних груп визначали за рівнянням Вант-Гоффа:

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

де ΔH – теплота іонізації каталітично активної групи; R-газова стала, що дорівнює 8,36 Дж·моль⁻¹; pK_1 , pK_2 – константи іонізації за температур T_1 і T_2 відповідно. Величини K_1 і K_2 знаходили за кривими $V=f(pH)$, визначеними в інтервалі температур 5-50 °С.

Фотоокислення проводили при різних значеннях рН і температури. Як джерело світла була використана лампа розжарення (200 Вт) з червоним світлофільтром, яка знаходилась на відстані 15 см від поверхні розчину. Як фотосенсибілізатор використовували 5×10⁻⁶ М метиленовий синій. Контролем слугували проби, що містили таку ж кількість фотосенсибілізатора в темряві, а також зразки, що освітлювалися тим же самим джерелом світла, але не містили барвника.

Вміст білка на всіх етапах дослідження реєстрували на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 280 нм, а його кількість визначали методом Lowry et al. [10].

Результати всіх досліджень статистично обробляли, використовуючи критерій Стюдента [11].

Результати та їх обговорення. Дослідження впливу іонів металів показали, що препарат α -L-рамнозидази *C. albidus* стійкий до дії наступних катіонів: NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , в той час як йони Cd^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} інгібували активність ензиму на 15-35 %. Суттєвий вплив мали катіони Ag^+ , які пригнічували активність α -L-рамнозидази на 72,5 % (табл. 1). Раніше іншими дослідниками також була показана інгібуюча дія Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} і Mn^{2+} на активність α -L-рамнозидаз *A. nidulans* [14], *A. aculeatus* [20], *A. niger* [19], *Sphingomonas sp. RI* [15].

Таблиця 1

Вплив катіонів металів та амонію на активність α -L-рамнозидази *C. albidus* ($M \pm m$, $n = 5$)

Катіон, 10^{-3}M	Активність, % після інкубації з катіонами, хв				
	0	15	30	45	60
Контроль	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
NH_4^+	98,5 \pm 1,2	97,0 \pm 0,8	96,4 \pm 0,9	95,1 \pm 2,2	95,5 \pm 2,4
K^+	100,0 \pm 0,1	90,8 \pm 0,7	90,5 \pm 0,3	85,3 \pm 3,6	86,5 \pm 2,3
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	99,5 \pm 0,3	100,0 \pm 0,2
Ag^+	80,0 \pm 1,9	70,5 \pm 2,0	50,0 \pm 5,0	27,5 \pm 0,7	27,5 \pm 0,7
Cd^{2+}	100 \pm 0,3	100 \pm 0,2	85,2 \pm 3,4	85,4 \pm 0,6	85,3 \pm 0,6
Ca^{2+}	100,0 \pm 0,1	100,0 \pm 0,1	99,8 \pm 1,3	99,4 \pm 4,0	99,7 \pm 0,4
Mg^{2+}	85,9 \pm 2,0	86,9 \pm 2,1	86,5 \pm 1,5	75,6 \pm 4,0	77,1 \pm 1,9
Hg^{2+}	100,0 \pm 0,1	100,0 \pm 2,0	100,1 \pm 0,4	98,0 \pm 0,5	99,7 \pm 0,4
Ni^{2+}	100 \pm 0,6	100 \pm 0,9	100 \pm 0,9	98,2 \pm 1,7	98,5 \pm 0,9
Mn^{2+}	100 \pm 0,6	100 \pm 1,6	100 \pm 0,9	85,5 \pm 4,0	85,5 \pm 3,7
Zn^{2+}	100,0 \pm 0,5	100,0 \pm 0,7	98,2 \pm 2,0	98,2 \pm 1,0	98,5 \pm 2,0
Co^{2+}	100 \pm 0,9	100 \pm 0,9	98,8 \pm 0,9	89,8 \pm 0,9	89,8 \pm 0,9
Cu^{2+}	100 \pm 0,5	85,6 \pm 2,0	85,1 \pm 1,7	85,1 \pm 1,0	85,0 \pm 1,0
Ba^{2+}	100,0 \pm 0,1	100 \pm 1,0	100 \pm 0,1	99,1 \pm 0,2	94,1 \pm 3,2
Pb^{2+}	91,7 \pm 0,7	98,7 \pm 0,7	98,7 \pm 0,7	90,7 \pm 5,0	97,7 \pm 1,9
Fe^{2+}	98,5 \pm 1,8	98,5 \pm 1,0	97,1 \pm 0,2	94,7 \pm 0,9	95,6 \pm 2,0
Fe^{3+}	94,1 \pm 0,2	94,1 \pm 3,0	93,2 \pm 3,0	92,3 \pm 2,0	93,0 \pm 1,8
Al^{3+}	90,0 \pm 0,1	90,7 \pm 2,9	80,3 \pm 4,0	80,6 \pm 3,8	80,4 \pm 4,6

Інгібіторний ефект Ag^+ на активність α -L-рамнозидаз раніше не досліджувався, але для α -галактозидази з *V. faba*, *P. canescens*, *C. cladosporioides* інгібування сріблом пояснюють комплексуванням ферменту з карбоксильними та імідазольними групами [13, 17, 18].

Відсутність дії досліджених іонів металів на активність α -L-рамнозидази підтверджує відомості [1] щодо незалежності активності цього ензиму від наявності у реакційному середовищі металів.

При вивченні дії різних аніонів (табл. 2) на активність α -L-рамнозидази *C. albidus* встановлено, що більшість із них практично не має суттєвого впливу. Показана лише інгібуюча дія сульфїту – на 58 % (табл. 2), що може свідчити про присутність в активному центрі ферменту або поблизу від нього SH-груп. Відомо [6], що сполуки, які містять близько розташовані SH-групи (дитіоли), мають високу спорідненість до арсенїту натрію, в результаті чого утворюються циклічні дитіоарсенїти. Було показано, що в концентрації 10^{-3} М арсенїт лише в дуже незначній мірі (5 %) інгібує активність ензиму (табл. 2). Цей факт дозволяє припустити, що в активному центрі α -L-рамнозидази відсутні сусідні з ним сульфїдрильні групи.

Незначна активуюча дія на α -L-рамнозидазу (7 %), обумовлена присутністю в реакційній суміші аніонів фосфору, фтору (на 5 %), карбонату (на 7 %) і тетраборату (на 9 %), ймовірно, має неспецифічний характер, оскільки активація ферменту не зростала в часі.

Механізм інгібуючої дії іонів металів на каталітичну активність встановити досить важко, оскільки їм властива здатність конкурувати з субстратом за місце зв'язування в активному центрі, а також можливість взаємодіяти з різними групами білкової молекули, що знаходяться поза активним центром, але можуть впливати на каталітичні функції ензиму, тобто зв'язуються з його алостеричним центром [9]. Відомо [2], що інгібування активності ензиму іонами важких металів може бути результатом утворення ними комплексів, в першу чергу з

сульфгідрильними, а також з карбоксильними або імідазольними групами білка. Для того щоб визначити, які саме групи в молекулі ензиму підлягають впливу важких металів і наскільки вони відповідальні за каталіз, необхідно провести кількісний аналіз інгібування на основі теорії Міхаеліса-Ментен, а це можливо лише в тому разі, коли інгібіторний ефект носить зворотний характер.

Таблиця 2

Вплив різних аніонів на активність α -L-рамнозидази *C. albidus* ($M \pm m$, $n = 5$)

Аніон, $10^{-3}M$	Активність, % після інкубації, хв				
	0 хв	15 хв	30 хв	45 хв	60 хв
Контроль	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Cl ⁻	100,0±0,3	100,0±0,3	100,0±0,3	100,0±0,3	100,0±0,3
I ⁻	105,3±0,7	105,5±5,0	100,0±0,2	100,0±0,1	98,3±2,7
F ⁻	100,3±0,1	105,9±4,5	97,9±0,3	105,6±2,0	105,6±2,1
Br ⁻	100,0±0,2	107,2±3,0	97,8±2,5	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	100,0±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 ⁻	100,6±1,6	101,0±0,7	100,0±0,6	99,9±0,1	107,8±2,1
S ₂ O ₃ ⁻²	98,9±5,0	100,1±0,8	99,8±0,3	97,0±0,9	96,9±5,0
SO ₃ ⁻²	90,3±0,7	90,5±0,5	42,5±0,3	42,5±0,3	42,5±0,3
SO ₄ ⁻²	100,0±0,1	100,0±0,1	100,0±0,1	100,0±0,1	100,0±0,1
AsO ₃ ⁻²	100,0±0,6	99,6±0,6	96,6±0,6	95,0±1,2	95,0±2,0
CO ₃ ⁻²	100,0±2,0	101,6±3,2	105,3±4,0	107,3±4,0	107,3±4,0
B ₄ O ₇ ⁻²	100±0,5	105±0,6	109±4,0	109±3,0	109±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 ₃ O ₆ ⁻	100,5±2,0	100,9±2,0	99,9±3,0	101,2±2,0	100,2±2,0

Досліджуючи вплив інгібіторів в динаміці, за формою кривих можна встановити характер інгібування. При зворотному характері інгібування криві, що відображають залежність величини від часу дії інгібітора при фіксованому вмісті його і ензиму, через деякий час виходять на плато, тобто не спостерігається збільшення інгібіторного ефекту в часі. Саме такий характер кривих має місце при інгібуванні α -L-рамнозидази *C. albidus* іонами срібла (рис. 1). При цьому слід зазначити, що ступінь інгібування, який відповідає даній концентрації інгібітора, проявляється в перші 30 хв інкубації. Зворотний характер інгібування активності ензиму підтверджується також тим, що діаліз препарату α -L-рамнозидази, інгібованого іонами Ag⁺, проти 0,01 М ФЦБ рН 5,2 протягом доби приводив до відновлення активності ферменту практично до початкової.

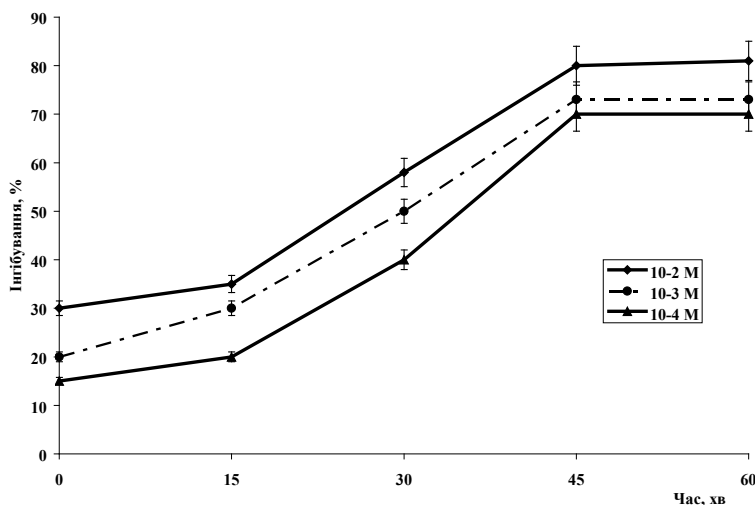


Рис. 1. Інгібування активності α -L-рамнозидази *C. albidus* іонами срібла в динаміці

З врахуванням зворотного характеру інгібування нами був використаний графічний метод подвійних зворотних величин, за допомогою якого встановлено (рис. 2), що іони Ag^+ інгібують α -L-рамнозидазу *C. albidus* за конкурентним типом. L-Рамноза, додана в реакційне середовище (кінцева концентрація 0,5-5 мМ) до внесення інгібуючого агента (іони Ag^+), проявляє захисну дію на молекулу ензиму (рис. 3). Оскільки L-рамноза є конкурентним інгібітором α -L-рамнозидази [9], можна припустити, що іони срібла взаємодіють із функціонально важливими групами (або групою) в активному центрі ензиму. Аналогічні дані були отримані раніше [10] для α -L-рамнозидази *Penicillium commune* 266.

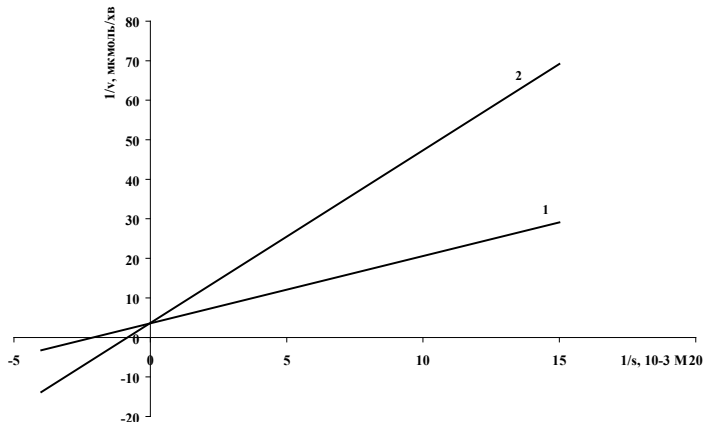


Рис. 2. Визначення характеру інгібування іонами срібла активності α -L-рамнозидази *C. albidus* за методом Лайнуівера-Берка. 1 – контроль (без інгібітора); 2 – AgNO_3 , 10^{-3}М .

Одним із підходів щодо вивчення механізму дії ензимів є дослідження впливу специфічних хімічних реагентів на їх активність. Нами були використані (табл. 3):

1. хелатуючі реагенти – ЕДТА, *o*-фенантролін;
2. реагенти на дисульфідні зв'язки – дитіотреїтол, L-цистеїн, β -меркаптоетанол;
3. реагенти на SH-групи – *n*-хлормеркурібензоат, N-етилmaleїмід;
4. реагенти на карбоксильні групи – 1-[3-(диметиламіно) пропіл]-3-етилкарбодимід методид.

Таблиця 3

Вплив деяких хімічних реагентів на активність α -L-рамнозидази *C. albidus* ($M \pm m$, $n = 5$)

Концентрація реагенту, 10^{-3} М	Активність, % при додаванні інгібіторів:				
	0 хв	15 хв	30 хв	45 хв	60 хв
Контроль	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
ЕДТА	100,0	100±0,1	100±0,1	100±0,1	100±0,1
<i>o</i> -Фенантролін	100,0	100,0	100±0,2	100±0,1	100 ±0,2
Дитіотреїтол	97,5±0,3	96,0±0,5	95,1±1,7	94,5±3,5	93,5±4,0
L-Цистеїн	100±0,7	100±1,3	100±0,1	98,5±2,2	98±2,0
β -Меркаптоетанол	100,0	98,2±1,7	97,5±3,2	97,7±1,8	97,7±1,6
<i>n</i> -Хлормеркурібензоат	100,0	100,0	98,4±0,5	95,2±3,2	90,1±5,0
N-Етилmaleїмід	100±0,1	100±1,0	98,2±2,0	97,1±0,1	96,5±0,9
1-[3-(Диметиламіно) пропіл]-3-етилкарбодимід методид	100±0,1	83,5±3,0	82,1±2,0	62,5±2,0	60±3,0

Хелатуючі агенти (ЕДТА, *o*-фенантролін) в концентрації 10^{-3}М не впливають на активність α -L-рамнозидази *C. albidus* (табл.3). Це може свідчити про те, що в каталізі, який здійснюється α -L-рамнозидазою, не беруть участі функціональні групи, що містять атоми металів. На основі цих даних, а також даних щодо впливу іонів металів можна припустити, що досліджувана α -L-рамнозидаза є металонезалежним ензимом. Аналогічні дані були отримані також для інших глікозидаз [1].

Реагенти, що відновлюють дисульфідні зв'язки – дитіотреїтол, L-цистеїн, β -меркаптоетанол, практично не впливали на активність α -L-рамнозидази *C. albidus* (табл. 3), що дає можливість припустити відсутність в її молекулі дисульфідних зв'язків.

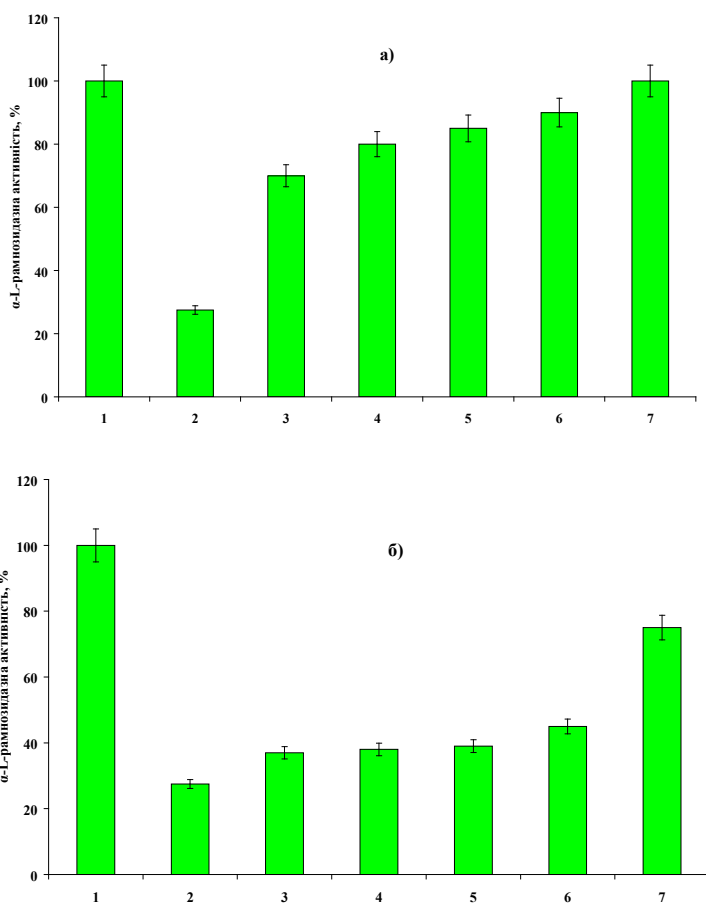


Рис. 3. Вплив L-рамнози на інгибування активності α -L-рамнозидази *C. albidus* іонами срібла: 1 – контроль (без інгібітора); 2 – AgNO_3 , 10^{-3}M ; 3 – те ж + L-рамноза, 0,5 мМ; 4 – те ж +L-рамноза, 1 мМ; 5 – те ж +L-рамноза, 2 мМ; 6 – те ж +L-рамноза, 4 мМ; 7 – те ж +L-рамноза, 5 мМ. L-рамноза, додана до (а) або після (б) обробки α -L-рамнозидази іонами срібла

Відомі тіолові інгібітори, такі як *n*-хлормеркурибензоат і *N*-етилмалеїмід не впливали на активність α -L-рамнозидази в концентрації 10^{-3}M (табл. 3), що дає змогу вважати, що в каталізі, який здійснюється α -L-рамнозидазою *C. albidus*, не беруть участі сульфгідрильні групи.

Оскільки 1-[3-(диметиламіно) пропіл]-3-етилкарбодимід метиодид, який модифікує карбоксильні групи амінокислот, інгибує активність α -L-рамнозидази на 40 % (табл. 3), можна припустити, що в молекулі α -L-рамнозидази присутні функціонально активні карбоксильні групи.

Одним із підходів при вивченні каталітично активних груп ензимів є їх ідентифікація за кривими залежності активності від значень рН. Для досліджуваної нами α -L-рамнозидази профіль кривої «активність – рН», $v=f(\text{pH})$ має «куполоподібну» форму (рис. 4). Висхідна («кисла») і низхідна («лужна») гілки кривої свідчать про те, що в елементарному акті розриву глікозидного зв'язку беруть участь дві функціональні групи. Форма обох гілок кривої є характерною для кривих дисоціації іонних груп амінокислот, а гілки кривої описуються рівнянням:

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

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

де V – активність ензиму за умови повного насичення субстратом; V_{\max} – та ж активність за умови оптимального значення рН ($\text{pH}_{\text{оп}}$); K_a і K_b – константи дисоціації каталітично актив-

них груп ензиму. Звідси випливає, що $pH=pK_b$ або при $pH=pK_a$ $V=V_{max}/2$, тобто при швидкості гідролізу субстрату, що дорівнює половині максимальної, константи іонізації каталітично активної групи ензиму чисельно дорівнюють концентрації H^+ в середовищі. Виходячи з вищевикладеного були розраховані величини pK_b і pK_a (2,9 і 7,1 відповідно) груп, що беруть участь в акті каталізу, що здійснюється α -L-рамнозидазою (рис. 4). Ці значення відповідають карбоксильній і імідазольній групам білків. Розраховані за цим методом величини pK_b і pK_a близькі до значень pK , знайденим за методом Діксона і Уеба [5]. Це дає підстави вважати, що іонізуються лише каталітично активні групи – карбоксильна та імідазольна.

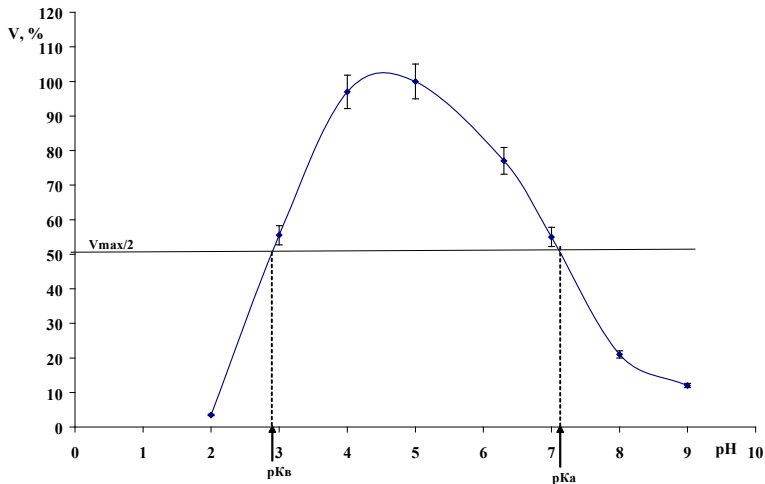


Рис. 4. Вплив pH на активність α -L-рамнозидази *C. albidus*. Початкова швидкість реакції – V; константа іонізації активної групи каталітичного центру ензиму для висхідної гілки кривої – pK_b ; константа іонізації активної групи каталітичного центру ензиму для низхідної гілки кривої – pK_a

Іншим важливим критерієм, що підтверджує наявність у каталітичному центрі α -L-рамнозидази карбоксильної та імідазольної груп, є визначення теплоти іонізації каталітично активних груп α -L-рамнозидази. Розраховані за рівнянням Вант-Гоффа [5] величини теплоти іонізації ΔH для pK_b і pK_a складають 7,2 та 29,1 кДж/моль відповідно. Це підтримує припущення про те, що в розщепленні глікозидного зв'язку α -L-рамнозидазою *C. albidus* беруть участь карбоксильна та імідазольна групи.

Специфічною реакцією на імідазольну групу гістидину є її фотоокислення в присутності метиленового синього, що відіграє роль фотосенсибілізатора. Фотоокислення приводить до розриву гетероциклу імідазолу і до інактивації ензиму. Дослідження щодо фотоокислення проводили в інтервалі pH 3,0-6,0 при температурі 20-50 °C в умовах, коли активність ензиму залишається незмінною. Було показано, що в умовах досліду препарат піддається інтенсивній фотоінактивації (рис. 5).

Поряд із фотоокисленням імідазольної групи гістидину ця реакція у білках властива також для фенольної групи тирозину та індольної групи триптофану. Однак, на відміну від цих груп, швидкість фотоокислення імідазольної групи залежить від pH середовища. Відомо, що необхідною умовою фотоінактивації ферментів є депротонування імідазольного кільця [5]. При високій концентрації у середовищі H^+ -іонів імідазольна група протонувана, що є перешкодою для віддачі електронів під впливом фотонів світла. Зі збільшенням значення pH середовища імідазольна група віддає протони і пропорційно зростає швидкість фотоокислення. Такої властивості не має ні фенольна група тирозину, ні індольна група триптофану.

Швидкість фотоокислення може бути описана рівнянням:

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

звідси випливає, що при $pH=pK_a$ $k=k_0/2$.

Крива $k=f(pH)$, яка описується рівнянням (3), в інтервалі pH 6,0-7,0 виходить на плато, що відповідає k_0 (рис.6). Точка перетину прямої, проведеної паралельно до осі абсцис на відстані $k_0/2$, відповідає pK 5,0, що свідчить про фотоокислення імідазольної групи гістидину.

При підвищенні температури величина pK_a також збільшується. Скориставшись формулою Вант-Гоффа ми розрахували теплоту іонізації даної групи, яка складає 29,7 кДж/моль і відповідає теплоті іонізації імідазольної групи.

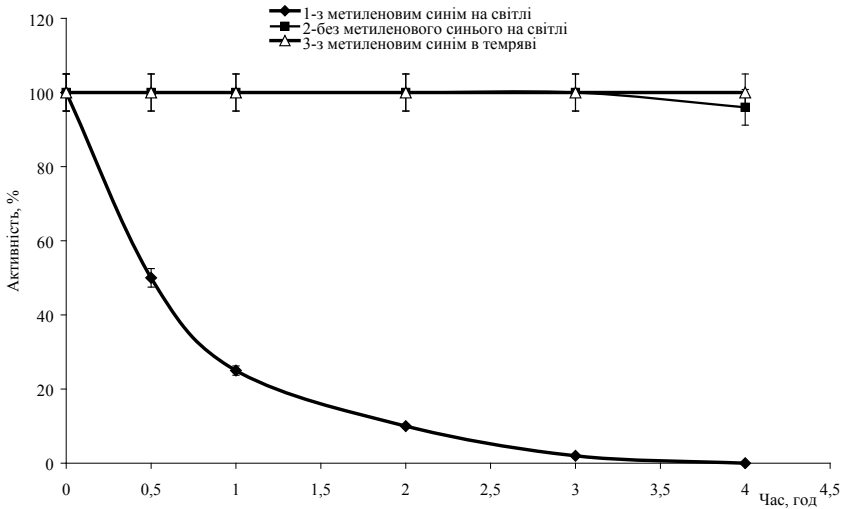


Рис. 5. Кінетика інактивації α -L-рамнозидази *C. albidus* в процесі фотоокислення, pH 5,0

Таким чином, знайдені нами величини теплоти іонізації і результати дослідів щодо фотоокислення дають можливість вважати, що каталітично активними групами α -L-рамнозидази *C. albidus*, є карбоксильна група С-кінцевої амінокислоти, а також імідазольна група гістидину.

Конкретних фактів щодо дії α -L-рамнозидаз дуже мало, оскільки відсутні дані щодо хімії та кінетики ензимів із більшості досліджених джерел. Хоча за аналогією з іншими глікозидазами ймовірно, що має місце розщеплення зв'язків між С-атомом рамнози і киснем субстратів. Так, встановлено, що розрив зв'язку проходить з того напрямку атому кисню, до якого прилягає нередукуючий залишок оліго- і полісахариду і до якого глікозидаза виявляє найбільшу специфічність. Відомо, що α -L-рамнозидаза у субстратах діє на C_1-O або $O-C_n$ (для α -L-рамнозидаз $n=2, 4, 6$) [1].

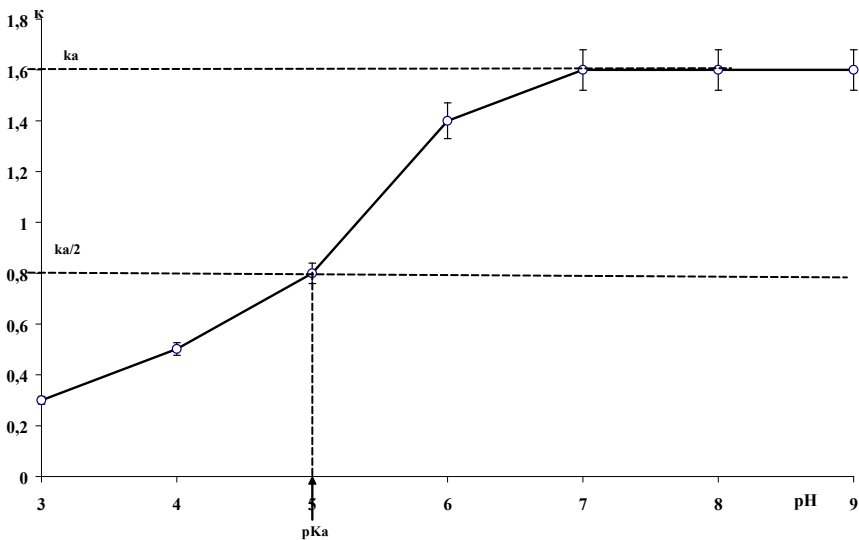


Рис. 6. Залежність $k = f(pH)$ при фотоокисленні ферментного препарату *C. albidus* при 20 °C

Таким чином, знайдені нами величини pK , розраховані величини теплоти іонізації та результати дослідів щодо фотоокислення дають підстави вважати, що каталітично активними

групами α -L-рамнозидази *C. albidus* є карбоксильна група аспарагінової, глутамінової, або іншої С-кінцевої амінокислоти та імідазольна група гістидину. В каталізі, що здійснюється α -L-рамнозидазою *C. albidus*, не беруть участі групи, які містять атоми металів, але присутність іонів Ag^+ в системі інгібує швидкість ензимної реакції.

Встановлення каталітично важливих груп активного центру ензиму дозволяє прогнозувати його поведінку в реакційних середовищах та керувати каталізом в умовах оптимізації ензиматичних процесів у біотехнології.

Автори висловлюють подяку канд. біол. наук, ст. наук сп. відділу фізіології промислових мікроорганізмів ІМВ НАН України С.С. Нагорній за люб'язно наданий для досліджень штам *Cryptococcus albidus*.

Е.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП α -L-РАМНОЗИДАЗЫ *CRYPTOCOCCUS ALBIDUS*

Резюме

Исследование влияния катионов, анионов и специфических химических реагентов: 1-[3-(диметиламино)пропил]-3-этилкарбодимид метиодид, ЭДТА, о-фенантролина, дитиотрейтола, L-цистеина, β -меркаптоэтанола, *n*-хлормеркурибензоата (*n*-ХМБ), N-этилмалеимида на активность α -L-рамнозидазы *C. albidus* свидетельствует, что существенное влияние оказывают ионы Ag^+ , которые ингибируют активность энзима на 72,5 %. Рамноза в концентрации 1-5 мМ защищает энзим от негативного действия ионов Ag^+ . На основании ингибиторного и кинетического анализа предполагается участие в каталитическом акте α -L-рамнозидазы карбоксильной группы С-терминальной аминокислоты и имидазольной группы гистидина.

Ключевые слова: α -L-рамнозидаза, *Cryptococcus albidus*, ионы металлов, специфические химические реагенты, функциональные группы.

O. V. Gudzenko, L. D. Varbanets

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

INVESTIGATIONS OF FUNCTIONAL GROUPS OF *CRYPTOCOCCUS ALBIDUS* α -L-RHAMNOSIDASE

S u m m a r y

The effect of cations, anions and specific chemical reagents: 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide, EDTA, *o*-phenantroline, dithiotreitol, L-cysteine, β -mercaptoethanol, *p*-chlormercurybenzoate (*p*-ChMB), N-ethylmaleimide on the α -L-rhamnosidase activity of *Cryptococcus albidus* has been investigated. The essential role of Ag^+ which inhibits the α -L-rhamnosidase activity by 72.5% was shown. Rhamnose at 1-5 mM protect the enzyme from the negative effect of Ag^+ . It was expected that carboxyl group of C-terminal aminoacid and imidazole group of histidine would participate in the catalytic action of α -L-rhamnosidase on the basis of inhibition and kinetic analysis.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: α -L-rhamnosidase, *Cryptococcus albidus*, metal ions, specific chemical reagents, functional groups.

The author's address: Gudzenko O.V., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St, Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Варбанець Л.Д., Борзова Н.В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. – К.: Наук. думка, 2010. – 437 с.
2. Виноградова Р.П. Молекулярные основы действия ферментов. – Киев: Вища шк., 1978. – 279 с.
3. Гудзенко О.В., Борзова Н.В., Варбанець Л.Д. Оптимізація умов культивування α -L-рамнозидаз – представників різних таксономічних груп мікроорганізмів // Мікробіол. журн. – 2011. – 73, №3. – С. 46–53.

4. Гудзенко О.В., Варбанець Л.Д. Очистка та фізико-хімічні властивості α -L-рамнозидази *Cryptococcus albidus* // Мікробіол. журн. – 2012. – **73**, №6.
5. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. – М.: Мир, 1982. – 816 с.
6. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика // М.: Мир, 1991. – 543 с.
7. Курганов Б.И., Петушкова Е.В. // Биохимия. – 1992. – **57**, вып.3. – С.348–361.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш.шк., 1990. – 352с.
9. Медянцева Э.П., Вертлиб М.Г., Будников Г.К. Ионы металлов как эффекторы ферментов // Успехи химии. – 1998. – **67**, №3. – С.252–260.
10. Рзасва О.М., Борзова Н.В., Варбанець Л.Д., Дослідження функціональних груп α -L-рамнозидаз *Penicillium commune* 266 // Укр.біохім. журн. – 2008. – **80**, №6. – С. 42–51.
11. Рзасва О.М., Варбанець Л.Д., Нагорна С.С., Скринінг продуцентів α -L-рамнозидази серед дріжджів // Мікробіол. журн. – 2010. – **72**, №6. – С.11–17.
12. Davis W.B. Determination of flavonones in citrus fruits // Anal. Chem. – 1947. – **19**, N 7. – P. 476–478.
13. Dey D.F., Pridham J. B., Sumar N. Multiple forms of *Vicia faba* α -galactosidases and their relationships // Phytochemistry. – 1982. – **21**, N 9. – P. 2195–2199.
14. Dowzer M., Kelly J.M. Cloning of *creA* gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression // Curr. Genet. – 1989. – **15**, N6. – P. 457–459.
15. Hashimoto W., Murata K. Alpha-L-rhamnosidase of *Sphingomonas* sp. R1 producing an unusual exopolysaccharide of sphingan // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1998. – **62**, N6. – P. 1068–1074.
16. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R. J. Protein measurement with folinphenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, N 2. –P. 265–275.
17. Malanchuk V.M., Buglova T.T., Varbanets L.D., et al. Substrate specificity of α -galactosidase from *Penicillium* sp. 23 // Мікробіол. журн. – 1999. – **61**, N 1. – С. 74–79.
18. Malanchuk V.M., Varbanets L.D., Buglova T.T., Zakharova I.Ya. Carbohydrate contributions to the react in rate, catalyzed by *Cladosporium* sp. 18 alpha-galactosidase // 10th European Carbohydrate symposium. Galway, Ireland, July 11-16, Abstract Book. – Galway, 1999. – P. 416.
19. Manzanares P., de Graaf L.H., Visser I. Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus niger* // FEMS Microbiol. Lett. – 1997. – **157**, N2. – P. 279–283.
20. Manzanares P., Orejas M., Ibanez E. Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus nidulans* // Lett. Appl. Microbiol. – 2000. – **31**. – P. 198–202.
21. Manzanares P., Valles S., Ramon D., Orejas M. α -L-Rhamnosidase: Old and New Insights // Industrial Enzymes. – Springer, 2007. – P. 117–140.
22. Takaaki Y., Michikatsu S. Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Pichia angusta* X 349 // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2000. – **64**. – P. 2179–2185.

Отримано 17.02.2011