

Е.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанец

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев МСП, ДОЗ680, Украина*

КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ α -L-РАМНОЗИДАЗЫ *EUPENICILLIUM ERUBESCENS*

*В результате исследования кинетических свойств α -L-рамнозидазы *Eupenicillium erubescens* было установлено, что K_m и V_{max} для синтетического субстрата составляют 1мМ и 120 мкмоль/мин/мг белка соответственно. Активность α -L-рамнозидазы конкурентно ингибировалась продуктом реакции – L-рамнозой, а константа ингибирования составляет $5,2 \cdot 10^{-2}$ М. В присутствии 10^{-3} М глюкозы отмечается торможение α -L-рамнозидазной реакции. Показано, что скорость ферментативного гидролиза нитрофенильного субстрата прямо пропорциональна концентрации фермента, а повышение концентрации субстрата выше оптимальной (5,0 мг/мл) снижало скорость реакции в связи с образованием неактивного фермент-субстратного комплекса FS₂.*

Ключевые слова: *Eupenicillium erubescens*, α -L-рамнозидаза, кинетические свойства, ингибирование.

α -L-Рамнозидаза (α -L-рамнозид-рамногидролаза – К.Ф. 3.2.1.40), гидролитически отщепляющая терминальные невосстановленные α -1,2, α -1,4 и α -1,6 связанные остатки L-рамнозы в α -L-рамнозидах, находит широкое применение в различных отраслях промышленности: пищевой, фармацевтической и химической.

При решении как научно-исследовательских, так и практических задач биохимии, биофизики, микробиологии и биотехнологии ведущая роль отводится ферментативной кинетике, поскольку знание таких параметров, как величины констант Михаэлиса (K_m) и максимальной скорости реакции (V), свидетельствуют не только о сродстве изучаемого фермента к субстрату, но и о возможности его использования в практических целях. Однако, сведения о кинетических свойствах α -L-рамнозидаз в литературе представлены недостаточно, поскольку лишь немногие из ферментов были выделены в гомогенном состоянии. Вместе с тем, именно эти исследования необходимы для понимания механизма действия ферментов и управления осуществляемым им катализом.

Целью данной работы было изучить некоторые параметры каталитической реакции, осуществляемой α -L-рамнозидазой *Eupenicillium erubescens*, которая, как было установлено нами ранее [5], проявляет высокую специфичность по отношению к терминальной α -L-рамнозе.

Материалы и методы. Объектом исследования был внеклеточный фермент α -L-рамнозидаза *E. erubescens* 248, выделенный и очищенный нами ранее [4] при помощи методов: гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. Его удельная активность составляла 120 ед/ мг белка (содержание белка – 0,01 мг/мл).

Для определения активности к 0,1 мл раствора фермента добавляли 0,2 мл 0,1 М фосфат-цитратного буфера (ФЦБ) pH 5,2 и 0,1 мл 0,01 М раствора субстрата в ФЦБ. Реакционную смесь инкубировали в стандартных условиях опыта в течение 10 мин при температуре 37°C. 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 [1] по поглощению при 400 нм на спектрофотометре СФ-26. За единицу активности α -L-рамнозидазы (Е) принимали количество фермента, которое гидролизует 1 мкмоль нитрофенильного субстрата в минуту в стандартных условиях опыта. Удельная активность – количество единиц активности, рассчитанное на 1 мг белка.

Кинетические свойства изучали, используя синтетический субстрат – *n*-нитрофенил- α -L-рамнопиранозид («Sigma-Aldrich», США).

Белок определяли методом Лоури [8].

Фермент инкубировали с углеводами в течение 1 ч при температуре 20 °С. Аликвоты по 0,1 мл, содержащие 1 мкг белка, отбирали через 15, 30, и 90 мин для определения α -L-

© Е.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанец, 2013

рамнозидазной активности. Все исследования проводили в 0,01 М фосфат-цитратном буфере рН 5,2.

Максимальную скорость реакции и константу Михаэлиса определяли по Лайнуиверу-Берку [6].

Результаты всех исследований статистически обрабатывали с использованием критерия Стьюдента [7].

Результаты и их обсуждение. В настоящее время в литературе имеются данные о том, что синтетические *n*-нитрофенильные субстраты в высоких концентрациях ингибируют активность многих гликозидаз [2]. Наши исследования показали, что кривая зависимости активности α -L-рамнозидазы от времени инкубации имеет обычный вид, когда постепенно увеличивается активность фермента, однако через определенный промежуток времени скорость реакции становится постоянной и кривая активности «выходит» на плато (рис. 1).

Зависимость скорости реакции от изменяющейся концентрации субстрата изучали в опытах, в которых концентрация фермента была постоянной и составляла 0,42 ед/мг белка. С увеличением концентрации субстрата скорость ферментативного гидролиза сначала возрастала, а затем снижалась (рис. 2). По экспериментальной кривой, построенной на основании данных рис. 2, определили, что максимальная скорость находится в интервале концентраций субстрата от 4,0 до 5,0 мг/мл.

Зависит ли максимальная скорость от концентрации фермента? Для выяснения этого вопроса нами были проведены исследования с разбавлением реакционной смеси.

Согласно принципу Ле Шателье, с увеличением концентрации субстрата должна возрастать доля фермента, связанного в неактивном комплексе, и соответственно снижаться его неактивная концентрация. Именно с этим связывают уменьшение скорости реакции при увеличении концентрации субстрата выше $C_{s\max}$ (концентрация субстрата, отвечающая максимуму скорости реакции). При описании кинетики реакции важно знать, насколько стабилен этот неактивный комплекс.

Было установлено (табл. 1), что несмотря на двукратное уменьшение концентрации фермента и субстрата скорость ферментативной реакции не только не уменьшалась, а наоборот, возрастала. Этот факт можно объяснить увеличением активной концентрации фермента за счет частичного разложения неактивного комплекса. Совпадение скоростей реакции в разбавленной смеси и контрольной дает основание полагать, что скорость образования неактивного комплекса при смешивании растворов субстрата и фермента (контрольная смесь) одного порядка со скоростью распада неактивного комплекса при разбавленной концентрации смеси. В результате этих исследований показано, что реакция образования неактивного комплекса обратима и равновесие в ней наступает относительно быстро.

В основу наших исследований было положено предположение об образовании двух промежуточных комплексов фермента F с субстратом S: активного FS и неактивного FS_{n+1} . Считается, что неактивный комплекс представляет собой продукт взаимодействия активного комплекса FS с молекулами субстрата. Эти молекулы, притягиваясь к активному комплексу под действием остаточных сил сродства фермента, препятствуют взаимодействию активного комплекса с водой.

Константа Михаэлиса (K_m) и максимальная скорость реакции (V_{\max}) для α -L-рамнозидазы, определенные с помощью кривой Лайнуивера – Берка (рис. 3), на синтетическом нитрофенильном субстрате при 37 °С и рН 5,2 составляли 1,0 мМ и 120 мкмоль/мин/мг белка соответственно. Эти значения K_m характерны также для описанных ранее [9] α -L-рамнозидаз *Aspergillus aculeatus* и *Penicillium species*.

Нами было исследовано влияние ряда углеводов на активность ферментного препарата. При выборе этих веществ мы руководствовались данными литературы [2, 9], а также результатами наших предварительных исследований [3].

Исследование ингибирования α -L-рамнозидазной реакции углеводами показало, что большинство из них не ингибирует активность и только D-глюкоза и L-рамноза (табл. 2) на 20-25 % снижают активность α -L-рамнозидазы в зависимости от времени инкубации.

С помощью метода Лайнуивера – Берка было установлено, что L-рамноза ингибирует α -L-рамнозидазу по конкурентному типу (рис. 4), а константа ингибирования продуктом реакции

составляет $5,2 \cdot 10^{-2}$ М. Известно, что конкурентное ингибирование может быть в двух случаях: когда ингибитор присоединяется к тем же формам, что и субстрат с варьируемой концентрацией, причем связывание одного лиганда исключает связывание другого, и, когда ингибитор, связываясь, вытесняет субстрат с изменяемой концентрацией. В обоих случаях связывание ингибитора препятствует связыванию субстрата.

Таким образом, проведенные исследования показали, что для α -L-рамнозидазы *E. erubescens* K_m и V_{max} для синтетического субстрата составляют 1,0 мМ и 120 мкмоль/мин/мг белка соответственно. Активность фермента конкурентно ингибируется L-рамнозой, а константа ингибирования составляет $5,2 \cdot 10^{-2}$ М. Показано, что скорость ферментативного гидролиза нитрофенильного субстрата прямо пропорциональна концентрации фермента. При повышении концентрации субстрата выше оптимальной (5,0 мг/мл) скорость реакции снижается.

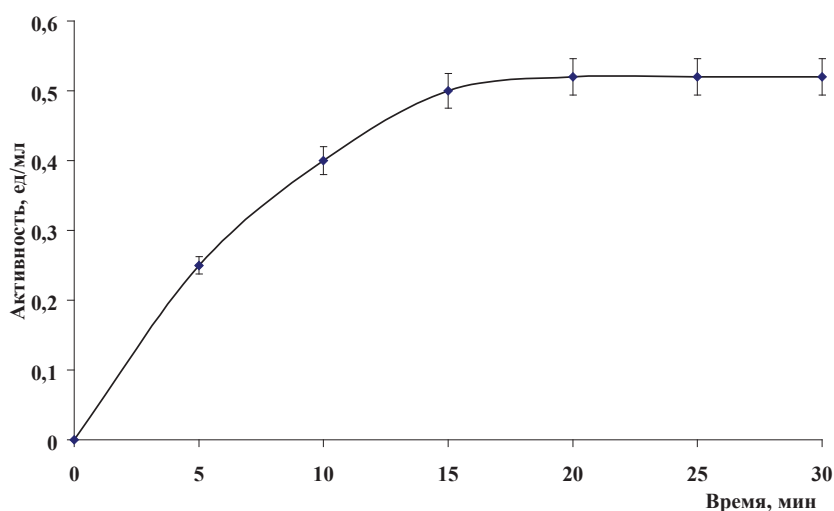


Рис. 1. Зависимость скорости гидролиза *p*-нитрофенил- α -L-рамнопиранозиды от времени инкубации

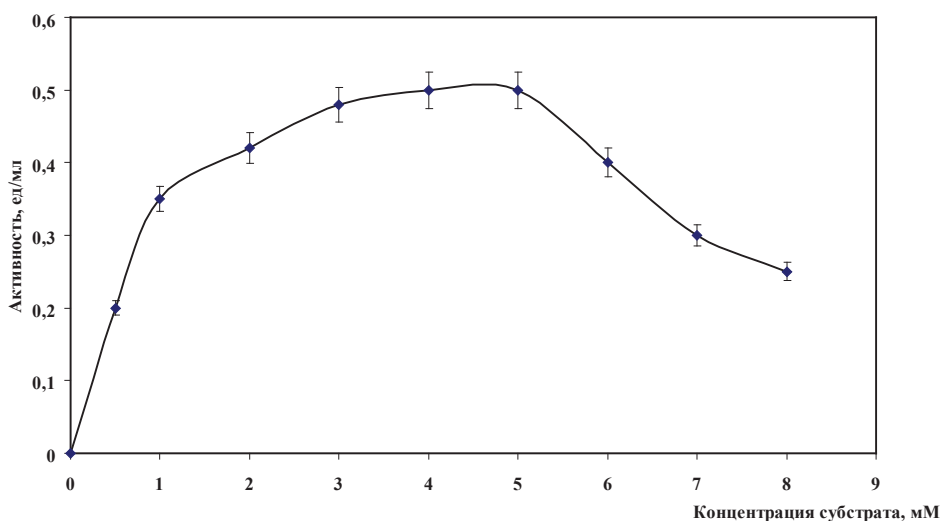


Рис. 2. Влияние концентрации субстрата на начальную скорость гидролиза *p*-нитрофенил- α -L-рамнопиранозиды

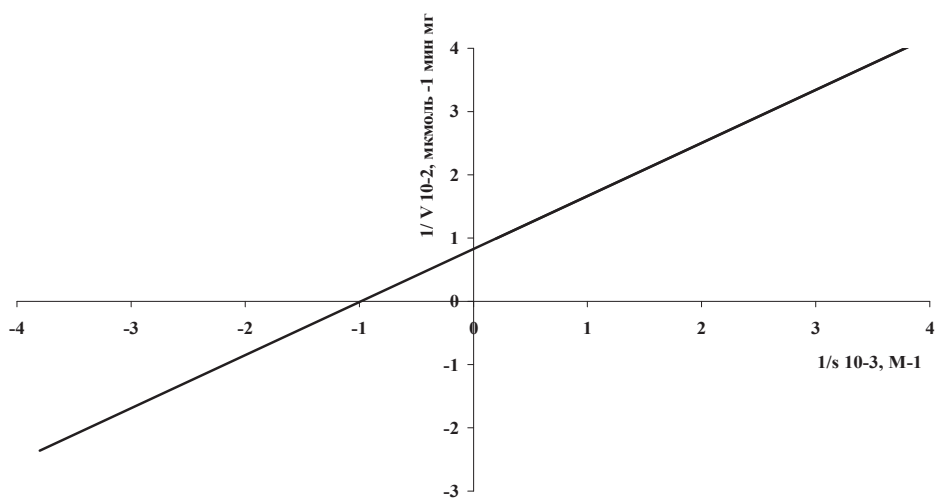


Рис. 3. Кинетика гидролиза *p*-нитрофенил- α -L-рамнопиранозида

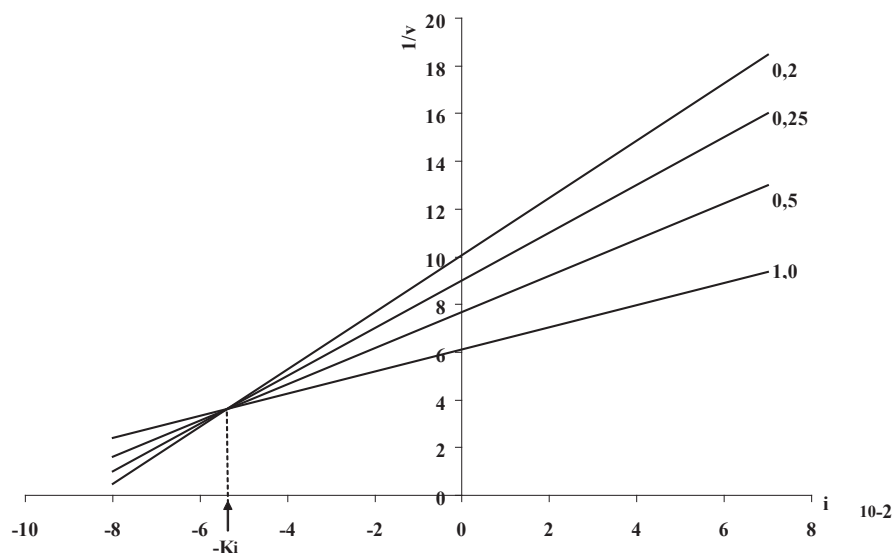


Рис. 4. Определение константы K_i из графика зависимости $1/v$ от i , построенных при различных значениях s

Таблица 1

Исследование стабильности неактивного фермент-субстратного комплекса

($M \pm m, n = 5$)

| Реакционная смесь | Концентрация | | Скорость реакции, мкмоль/мин/мг белка | |
|-------------------|-------------------------|--|---------------------------------------|-----------------|
| | α -L-рамнозидазы | <i>p</i> -нитрофенил- α -L-рамнопиранозид | 30 мин | 60 мин |
| Концентрированная | 0,2 | 4 | 0,24 \pm 0,02 | 0,26 \pm 0,02 |
| Разбавленная | 0,1 | 2 | 0,42 \pm 0,01 | 0,42 \pm 0,01 |
| Контрольная | 0,1 | 2 | 0,43 \pm 0,01 | 0,42 \pm 0,01 |

Таблица 2

**Влияние некоторых углеводов и их производных
на активность α -L-рамнозидазы *E. erubescens* ($M \pm m$, $n = 5$)**

| Углевод | Активность, % | | |
|----------------|---------------|---------|---------|
| | 15 мин | 30 мин | 90 мин |
| Контроль | 100±0,1 | 100±0,1 | 100±0,1 |
| L-арабиноза | 105±0,1 | 100±0,1 | 100±0,1 |
| D-глюкоза | 90±0,2 | 80±0,5 | 75±0,5 |
| D-галактоза | 105±0,1 | 100±0,1 | 100±0,1 |
| D-маноза | 105±0,2 | 105±0,1 | 105±0,2 |
| D-фукоза | 100±0,1 | 100±0,1 | 100±0,1 |
| Сахароза | 100±0,1 | 95±0,5 | 100±0,1 |
| Лактоза | 100±0,3 | 105±0,1 | 100±0,1 |
| Мальтоза | 100±0,2 | 100±0,1 | 100±0,1 |
| Мелибиоза | 100±0,1 | 95±0,5 | 100±0,1 |
| Раффиноза | 105±0,1 | 86±0,4 | 100±0,1 |
| Стахиоза | 105±0,1 | 95±0,5 | 100±0,1 |
| D-галактозамин | 105±0,1 | 100±0,1 | 105±0,3 |
| D-глюкозамин | 100±0,2 | 100±0,2 | 100±0,2 |
| L-рамноза | 90±0,3 | 80±0,5 | 75±0,5 |
| Галактоманнан | 105±0,2 | 100±0,1 | 100±0,2 |
| D-фруктоза | 100±0,1 | 100±0,1 | 100±0,1 |
| D-ксилоза | 100±0,1 | 100±0,1 | 100±0,1 |

О.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанець

Институт мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

**КІНЕТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ α -L-РАМНОЗИДАЗИ *EUPENICILLIUM*
*ERUBESCENS***

Резюме

В результаті дослідження кінетичних властивостей α -L-рамнозидази *Eupenicillium erubescens* було встановлено, що K_m і V_{max} для синтетичного нітрофенільного субстрату становили 1,0 мМ і 120 мкмоль/хв/мг білка відповідно. α -L-Рамнозидаза конкурентно інгібувалась продуктом реакції – L-рамнозою, константа інгібування становила $5,2 \cdot 10^{-3}$ М. За наявності 10^{-3} М глюкози спостерігали гальмування α -L-рамнозидазної реакції. Показано, що швидкість ферментативного гідролізу нітрофенільного субстрату прямо пропорційна концентрації ферменту, а підвищення концентрації субстрату вище оптимальної (5,0 мг/мл) знижувало швидкість реакції у зв'язку з утворенням неактивного фермент-субстратного комплексу FS₂.

Ключові слова: α -L-рамнозидаза, кінетичні властивості, нітрофенільний субстрат, інгібування, фермент-субстратний комплекс.

E.V. Gudzenko, L.D. Varbanets

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

**KINETIC CHARACTERISTICS OF α -L- RHAMNOSIDASE
OF *EUPENICILLIUM ERUBESCENS***

S u m m a r y

It was established, as a result of investigations of the α -L-rhamnosidase of *Eupenicillium erubescens* kinetic properties, that K_m and V_{max} for the corresponding synthetic substrate were 1.0 mM and 120 μ mol/min/mg of protein, respectively. α -L-Rhamnosidase was also competitively inhibited by the reaction product – L-rhamnose, the inhibition constant was $5.2 \cdot 10^{-2}$ M. One could also observe the inhibition of α -L-rhamnosidase reaction in the presence of 10^{-3} M of glucose. It was shown that the rate of enzymatic hydrolysis of nitrophenyl substrate was directly proportional to the concentration of enzyme, and the increase of the substrate concentration leads to the increase of hydrolysis rate. The substrate concentration being increased above the optimal one (5.0 mg/ml), the reaction rate decreases due to the formation of inactive enzyme-substrate complex FS_2 .

The paper is presented in Russian

K e y w o r d s: α -L-rhamnosidase, kinetic properties, nitrophenyl substrates, inhibition, enzyme-substrate complex.

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

1. Борзова Н.В., Маланчук В.Н. Скрининг продуцентов α -N-ацетилгалактозаминидазы среди микроорганизмов различных таксономических групп // Микробиол. журн. – 2000. – 62, № 5. – С. 34–41.
2. Варбанець Л.Д., Борзова Н.В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. – Київ: Наук. думка, 2010. – 437 с.
3. Гудзенко Е.В., Варбанець Л.Д. Очистка и физико-химические свойства α -L-рамнозидазы *Eupenicillium erubescens*// Микробиол. журн. – 2012. – 74, № 2. – С. 14–21.
4. Гудзенко О.В., Борзова Н.В., Варбанець Л.Д. Оптимізація умов культивування продуцентів α -L-рамнозидаз – представників різних таксономічних груп мікроорганізмів // Микробиол. журн. – 2011. – 73, № 3. – С. 46–53.
5. Гудзенко Е.В., Варбанець Л.Д. Кинетические характеристики α -L-рамнозидазы *Eupenicillium erubescens* // Материалы 3 съезда микологов России “Современная микология в России” (Москва 2012). –Тез. докл.: Москва, 2012. – С. 375.
6. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. – М.: Мир, 1982. – 816 с.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш.шк., 1990. – 352с.
8. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, N 1. – P. 265–275.
9. Manzanares P., Valles S., Ramon D., Orejas M. α -L-Rhamnosidase: old and new insights //Industrial Enzymes. – Springer, 2007. – P. 117–140.

Отримано 18.09.2012