

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ ГРИБНЫХ ГЛАКТОЗИДАЗ

Н. В. Борзова  
Л. Д. Варбанец

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

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Получено 17.07.2011

Актуальной задачей современной прикладной энзимологии, в частности инженерии энзимов, является повышение их стабильности в различных, часто экстремальных, условиях реакционной среды.

Сравнительное изучение термостабильности нативных и модифицированных различными методами  $\alpha$ -галактозидаз из трех грибных продуцентов — *Aspergillus niger*, *Penicillium canescens* и *Cladosporium cladosporioides* свидетельствует о том, что обработка энзимов целлюлозой, декстранами Т500 и Т20, а также полиэтиленгликолями 6 000 и 1 500 приводит к их термостабилизации при 55 и 60 °С. Эффективным оказался также подход, основанный на гидрофобной модификации  $\alpha$ -галактозидаз ацилированием аминокрупп лизина и глицина 2,6-диаминопимелиновой кислотой, янтарным ангидридом и глицином. В результате таких взаимодействий термостабильность  $\alpha$ -галактозидаз была повышена в 1,5–5 раз.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -галактозидазы *Aspergillus niger*, *Penicillium canescens* и *Cladosporium cladosporioides*, термостабилизация, химическая модификация энзимов.

Известно, что на стабильность и другие характеристики протеина значительное влияние может оказывать гидрофильно-липофильный баланс поверхности. Для изменения первого свойства можно применять различные методы, одним из которых является химическая модификация. Не затрагивая активных центров энзимов, она способна приводить к существенным изменениям субстратной специфичности, каталитической активности и стабильности.

На сегодняшний день существует ряд работ [1–3], в которых показано, как изменение гидрофильно-липофильного баланса приводит к изменению активности и стабильности энзимов. Однако однозначного ответа на вопрос, как именно изменится стабильность энзима в результате модификации протеина гидрофобными или гидрофильными реагентами, нет. Также отсутствуют данные по химической модификации  $\alpha$ -галактозидаз. Поэтому была проведена работа по модификации  $\alpha$ -галактозидаз из трех грибных продуцентов — *Aspergillus niger*, *Penicillium canescens* и *Cladosporium cladosporioides*. Эти энзимы характеризуются близкими физико-химическими свойствами, имеют много общего в механизме термоденатурации и при этом резко отлича-

ются между собой по специфичности действия и сродству к субстрату.

Существенный вклад в стабилизацию протеиновой молекулы могут вносить ионы, кофакторы, метаболиты и другие вещества [4], в присутствии которых температура денатурации протеинов, в частности энзимов, может сдвигаться к верхнему температурному пределу деградации. Нами было изучено влияние большого количества соединений различной природы на активность и стабильность  $\alpha$ -галактозидаз. Ранее [5, 6] была показана возможность стабилизировать  $\alpha$ -галактозидазы в присутствии ряда углеводов и субстратов этих энзимов, а также при иммобилизации на человеческом сывороточном альбумине.

Целью данной работы было изучить возможность химической модификации трех грибных  $\alpha$ -галактозидаз и влияние такой модификации на стабильность энзимов в условиях термоденатурации. Для решения этой задачи были использованы такие подходы: иммобилизация на целлюлозе и ее производных, модификация на растворимых полимерах — декстранах и ПАВ, сульфгидрильных групп специфическими реагентами, гидрофобная модификация глицином и янтарным ангидридом.

## Матеріали і методи

Использованные препараты  $\alpha$ -галактозидаз были выделены из культуральной жидкости продуцентов согласно ранее разработанным методикам [7, 8].

Активность  $\alpha$ -галактозидазы определяли с помощью субстрата реакции — *p*-нитрофенил- $\alpha$ -D-галактопиранозида (Sigma, США) [9]. За единицу активности принимали количество энзима, гидролизующее 1 мкмоль субстрата в 1 мин в условиях опыта.

Термоинактивацию  $\alpha$ -галактозидаз исследовали при температуре 55–60 °С, pH 5,2 (1,0 мМ фосфатно-цитратный буфер — ФЦБ). Кинетику термоинактивации изучали следующим образом. Образцы нативного и модифицированного энзима 0,05–0,5 Е/мл в 1 мМ ФЦБ, pH 5,2, выдерживали при заданной температуре на протяжении 1,5–3 ч. Через определенные промежутки времени (10–30 мин) отбирали аликвоты по 0,1 мл и измеряли  $\alpha$ -галактозидазную активность.

Иммобилизацию энзимов на целлюлозе и ее производных проводили, смешивая полимеры с энзимами в ФЦБ в конечной концентрации 25 и 5 мкг на 10 мкг протеина, с использованием целлюлозы, микрокристаллической целлюлозы (МК-целлюлозы), карбоксиметилцеллюлозы (КМ-целлюлозы), диэтиламиноэтилцеллюлозы (ДЭАЭ-целлюлоза) и сервацела КМ 32. Выдерживали смеси при 30 °С и постоянном перемешивании 24 ч, центрифугированием (8 000 g, 5 мин) отделяли нерастворимый компонент смеси от растворимого. В процессе адсорбции энзимов на носителе при их взаимодействии возникают солевые связи, а также другие слабые взаимодействия (водородные, ван-дер-ваальсовы). Далее изучали активность полученных энзимных препаратов при 37 °С и в условиях термоденатурации.

Обработку  $\alpha$ -галактозидаз осуществляли также декстранами Т500 и Т20, ПЭГ 6 000 и ПЭГ 1 500 (5 г/л), цетилтриметиламмония бромидом (ЦТАБ, в концентрации  $10^{-2}$ – $10^{-6}$  М), *n*-хлормеркурибензоатом (*n*-ХМБ) ( $10^{-3}$ – $10^{-5}$  М), глицином (0,1 М), 2,6-диаминопимелиновой кислотой ( $10^{-3}$  М), диэтилпиروкарбонатом натрия (1%), янтарным ангидридом ( $10^{-2}$ – $10^{-5}$  М). Все энзимные препараты были предварительно выдержаны 24 ч в присутствии модификаторов при 20 °С (ФЦБ, pH 5,2), и это не вызывало снижения активности. Модифицированные энзимы отделяли от низкомолекулярных реагентов диализом или гель-фильтрацией.

Расчет констант термоинактивации выполняли в соответствии с работой Полторака и др. [10].

Статистическую обработку трех-пяти экспериментальных серий исследований проводили стандартными методами с определением *t*-критерия Стьюдента при 5%-м уровне значимости.

## Результаты и обсуждение

Сравнительное изучение термостабильности нативных и модифицированных  $\alpha$ -галактозидаз из трех грибных продуцентов (рис. 1) показало, что связывание с целлюлозными препаратами  $\alpha$ -галактозидазы из *A. niger* нецелесообразно проводить при концентрации 25 мкг целлюлозы/10 мкг протеина, поскольку высокие концентрации целлюлозных производных приводили к снижению термостабильности и практически полной инактивации энзима в условиях эксперимента. Связывание с ДЭАЭ-целлюлозой вызывало инактивацию всех трех  $\alpha$ -галактозидаз в течение первого часа термообработки при 55 °С.

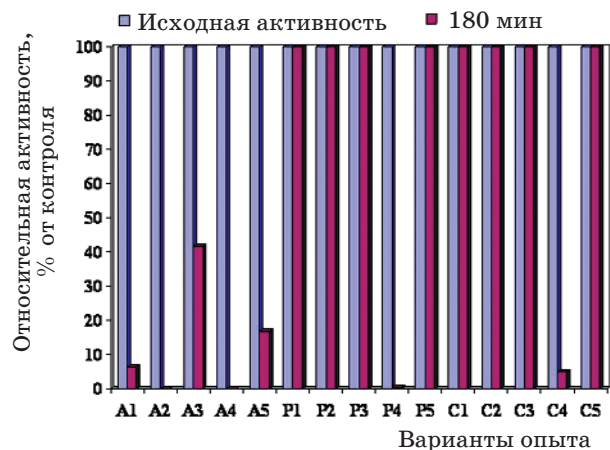


Рис. 1. Активность  $\alpha$ -галактозидаз *A. niger* (А), *P. canescens* (Р), *C. cladosporioides* (С) после модификации энзимов целлюлозой:

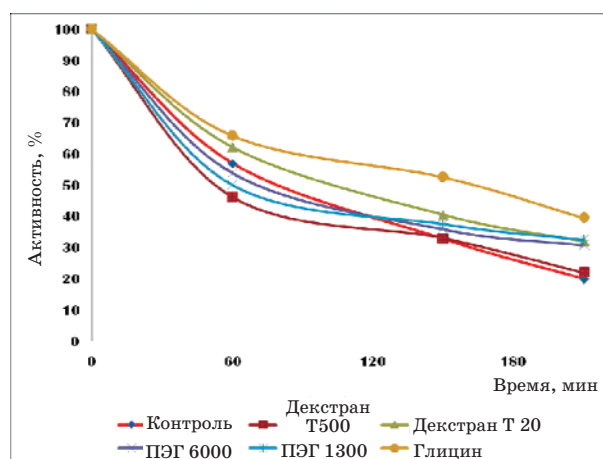
1 — целлюлоза; 2 — МК-целлюлоза; 3 — КМ-целлюлоза; 4 — ДЭАЭ-целлюлоза; 5 — сервацел КМ 32. Концентрация реагентов — 25 мкг/10 мкг протеина. Инкубация — 3 ч при 55 °С

Снижение концентрации целлюлозы в 5 раз позволило увеличить период полуинактивации энзимов при 57 °С до 10 раз. Наиболее эффективными в условиях термоденатурации были  $\alpha$ -галактозидазы в сочетании с сервацеллом, КМ- и ДЭАЭ-целлюлозой. Значения константы денатурации увеличивались в некоторых случаях почти на порядок. Так, константа термоденатурации для нативной  $\alpha$ -галактозидазы *A. niger* при 57 °С составляла  $4,1 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ , а для адсорбированной на сервацелле КМ 32 —  $0,8 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ . Константы

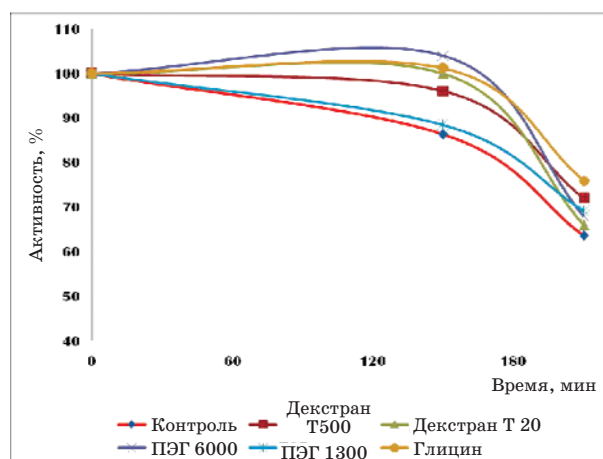
денатурации для нативных  $\alpha$ -галактозидаз *P. canescens* и *C. cladosporioides* в этих условиях составляли  $5,8 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$  и  $7,2 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ . В случае иммобилизации энзима *P. canescens* на КМ-целлюлозе и сервацеле его термостабильность увеличивалась примерно в 7–9 раз (кден составили, соответственно,  $8,3 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$  и  $6,45 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ ). Показатели кден для препаратов  $\alpha$ -галактозидазы *C. cladosporioides*, связанных на КМ-целлюлозе и сервацеле, также были близки между собой — 8,6 и  $9,2 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ , а максимальный эффект достигался при иммобилизации энзима на ДЭАЭ-целлюлозе,  $k_{\text{ден}} 9,8 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ .

Обработка  $\alpha$ -галактозидаз декстранами Т500 и Т20, ПЭГ 6 000 и ПЭГ 1 500, а также глицином способствовала термостабилизации энзимов при  $55^\circ \text{C}$  (рис. 2). Однако следует отметить различия в динамике этого процесса у  $\alpha$ -галактозидаз из разных источников. Пока сложно указать на конкретные механизмы стабилизации в каждом случае, для этого нужно провести дополнительные исследования, в том числе рентгеноструктурные и ИК-спектроскопические. Мы можем только предполагать, что это связано с конформационными особенностями молекул исследованных  $\alpha$ -галактозидаз. Модификация физиологически активных веществ протеиновой природы растворимыми полимерами и полисахаридами повышает их конформационную стабильность и устойчивость посредством многоточечного связывания и модификации остатков лизина [11]. Кроме того, такое связывание обеспечивает устойчивость протеинов к протеолизу. Наличие в декстранах большого количества гидроксильных групп делает возможной их модификацию. Еще одним из способов направленного изменения структурных характеристик протеинов является введение в систему ПАВ. Следует отметить некоторые отличия в степени и характере влияния использованных веществ на разные энзимы, что, по нашему мнению, может косвенно указывать на различия в расположении заряженных групп на поверхности протеиновой глобулы. Можно предположить, что в поддержании активной конформации  $\alpha$ -галактозидаз *A. niger* и *P. canescens* глицин играет более существенную роль, чем в молекуле  $\alpha$ -галактозидазы *C. cladosporioides*. Также было показано, что глицин и ПЭГ способствовали эффективной термостабилизации  $\alpha$ -галактозидаз и при  $60^\circ \text{C}$ .

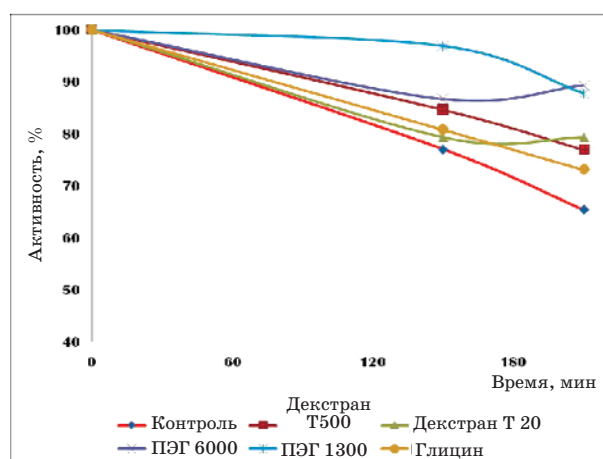
Кроме неионогенного ПЭГ, было изучено влияние катионного ПАВ — ЦТАБ. Есть данные [12], что в этом случае ЦТАБ с протеи-



А



Б



В

Рис. 2. Зависимость активности модифицированных  $\alpha$ -галактозидаз *A. niger* (А), *P. canescens* (Б), *C. cladosporioides* (В) от времени термоинактивации (рН 5,2,  $t = 55^\circ \text{C}$ )

ном образуют комплексы переменного состава, при этом наблюдаются существенные конформационные изменения вторичной структуры — доля спиральных  $\alpha$ -цепей уменьшается, а термическая устойчивость возрастает. При низких концентрациях ПАВ взаимодействие имеет электростатическую природу в результате связывания ионов ПАВ противоположно заряженными группами протеина, а при высоких концентрациях определяющую роль играют гидрофобные взаимодействия. Однако было отмечено, что в отличие от ПЭГ образованные в этом случае комплексы ЦТАБ–энзим (об их образовании свидетельствует линейный характер зависимости активности энзимов от концентрации ЦТАБ, рис. 3) характеризовались значительно меньшей термостабильностью и полностью инактивировались при 55 °С в течение 30 мин.

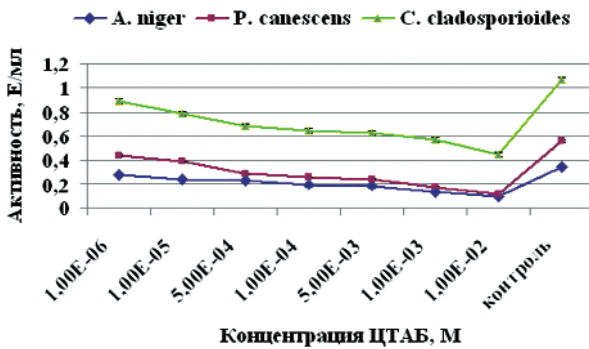


Рис. 3. Зависимость активности  $\alpha$ -галактозидаз от концентрации цетилтриметиламмония бромида при 20 °С, 30 мин

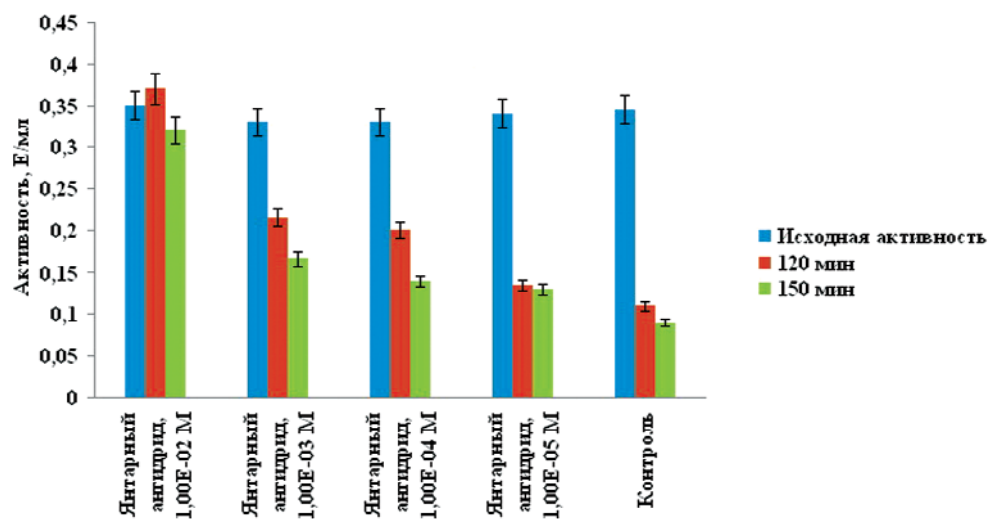


Рис. 4. Зависимость активности  $\alpha$ -галактозидазы *A. niger* от концентрации янтарного ангидрида (температура инкубации — 55 °С)

Использование янтарного ангидрида позволяло увеличить период полуинактивации всех изученных  $\alpha$ -галактозидаз, хотя и в разных концентрациях и в различной степени. Максимальный эффект наблюдался при обработке  $\alpha$ -галактозидазы *A. niger* в концентрации  $10^{-2}$  М (рис. 4). Константы термоинактивации при оптимальных концентрациях янтарного ангидрида снижались в 5; 1,5 и 2 раза для  $\alpha$ -галактозидаз *A. niger*, *P. canescens* и *C. cladosporioides*, соответственно. Отмеченный эффект связан, вероятно, со стабилизацией активной формы энзимов через усиление межсубъединичных взаимодействий путем ацилирования  $\alpha$ -аминогрупп остатков лизина.

Поскольку ранее была показана важная роль SH-групп в поддержании активной конформации молекул всех трех  $\alpha$ -галактозидаз [7, 8], нами применялись для обработки энзимов такие протекторы этих групп, как цистеин и дитиотреитол. Однако в использованной концентрации эти вещества стабилизировали  $\alpha$ -галактозидазы лишь в незначительной степени, а все изменения активности происходили в пределах погрешности опыта. Использование диэтилпиروкарбоната и *n*-ХМБ — модификаторов гистидина и сульфгидрильных групп — в исследованных концентрациях либо не приводило к изменению каталитической активности энзимов в условиях термоденатурации (рис. 5), либо ускоряло их инактивацию, предположительно за счет облегчения перехода протеиновой глобулы в развернутое состояние. Присутствие 2,6-диаминопимелиновой кислоты, которая является предшественником L-лизина, оказывало незначитель-

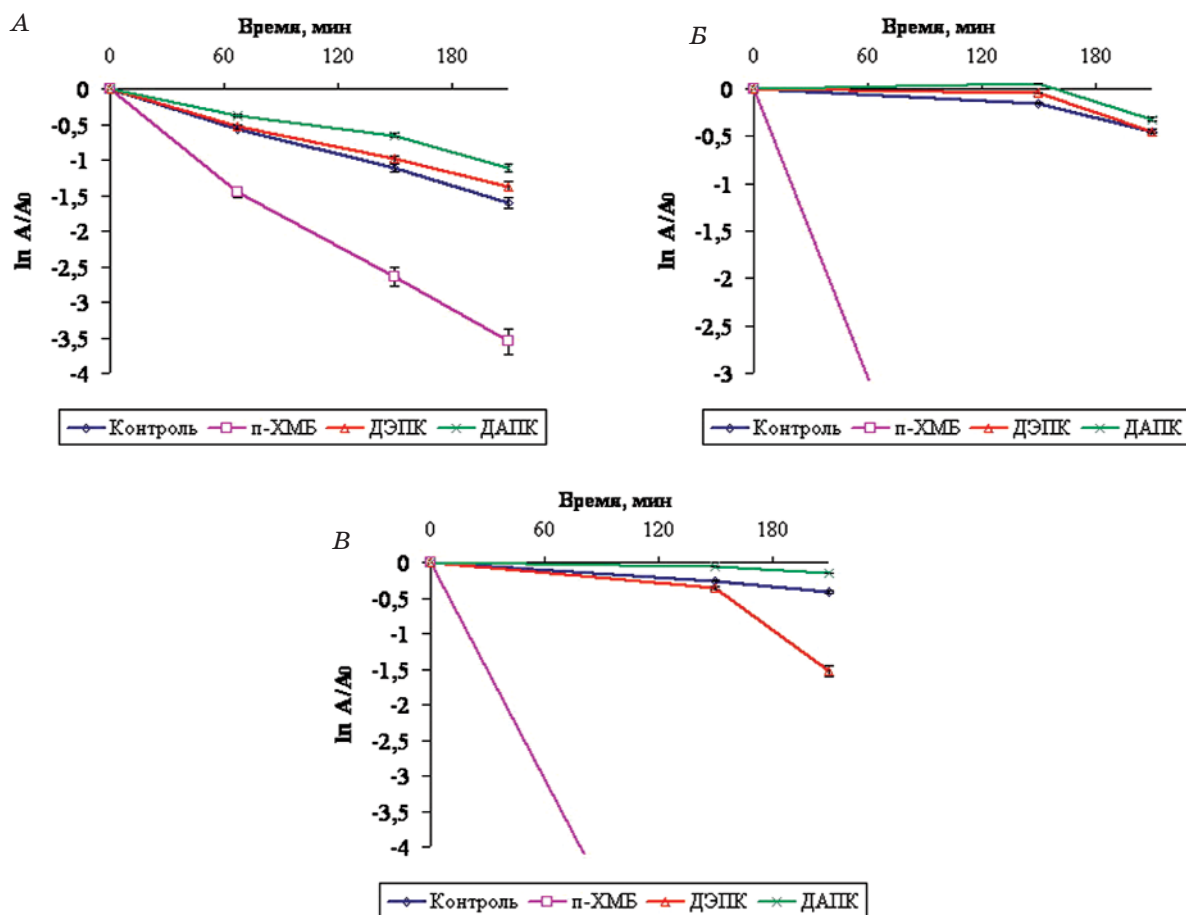


Рис. 5. Кинетические кривые термоинактивации  $\alpha$ -галактозидаз *A. niger* (А), *P. canescens* (В) и *C. cladosporioides* (В) в полулогарифмических координатах при 55 °С: обработка *n*-ХМБ ( $10^{-5}$  М), 2,6-диаминопимелиновой кислотой (ДАПК,  $10^{-3}$  М), диэтилпиpecарбонатом натрия (ДЭПК, 1%)

ный стабилизирующий эффект, возможно за счет связывания с поверхностными остатками лизина, что в свою очередь обеспечивало межмолекулярные сшивки и способствовало сохранению активной конформации протеиновой молекулы.

Таким образом, нами проведена работа по исследованию путей модификации грибных  $\alpha$ -галактозидаз с целью как выяснения структурно-функциональных различий между ними, так и для получения практически важных высокостабильных препаратов этих энзимов. Показано, что иммобилизация на биополимерах (целлюлозе и декстранах) при-

водит к термостабилизации грибных  $\alpha$ -галактозидаз. Также эффективным может быть подход, основанный на гидрофобной модификации молекул энзимов ацилированием аминогрупп лизина и глицина с помощью 2,6-диаминопимелиновой кислоты, янтарного ангидрида и глицина. Эти результаты могут свидетельствовать о том, что исследованные гликозидазы не относятся к протеинам, функционирующим в частично развернутом состоянии. На основе полученных данных планируется разработать мицелярно-полиэлектролитную композицию или липосомную форму для создания препаратов  $\alpha$ -галактозидаз пролонгированного действия.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Трофимова Д. Н., Камышный А. Л., Магдасци Ш., Левашов А. В. Влияние химической модификации на стабильность глюкозооксидазы и формиатдегидрогеназы // Вестн.

Моск. ун-та. Серия 2. Химия. — 2003. — Т. 44, № 1. — С. 48–52.

2. Трофимова Д. Н., Левашов А. В. Фиксация мономерной формы формиатдегидрогеназы в системе обращенных мицелл путем моди-

- фикації фермента глюкозой // Там же. — 2000. — Т. 41, № 6. — С. 390–394.
3. *Plou F. J., Ballesteros A.* Acylation of subtilisin with long fatty acyl residues affects its activity and thermostability in aqueous medium // *FEBS Let.* — 1994. — V. 339, N 1–2. — P. 200–204.
  4. *Янике Р.* Что можно узнать о стабилизации белка из исследований ультрастабильных глобулярных белков // *Биохимия.* — 1998. — Т. 63, № 3. — С. 370–380.
  5. *Борзова Н. В., Варбанец Л. Д.* Термоинактивация  $\alpha$ -галактозидазы *Penicillium canescens* // *Укр. біохім. журн.* — 2010. — Т. 82, № 3. — С. 24–30.
  6. *Борзова Н. В., Варбанец Л. Д.* Исследование термоинактивации  $\alpha$ -галактозидазы *Cladosporium cladosporioides* // *Микробиол. биотехнол.* — 2010. — № 1. — С. 30–36.
  7. *Маланчук В. М.*  $\alpha$ -Галактозидаза *Penicillium canescens* 239 і *Cladosporium cladosporioides* 189. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 2000. — 21 с.
  8. *Борзова Н. В.*  $\alpha$ -N-ацетилгалактозамінідаза та  $\alpha$ -галактозидаза *Aspergillus niger* 185ш. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 2003. — 21 с.
  9. *Chaplin M. E., Kennedy J. E.* Carbohydrate analysis. — Oxford; Washington: IRL Press, 1986. — 228 p.
  10. *Полтораєк О. М., Чухрай Е. С., Торшин І. Ю.* Диссоціативна термоинактивация, стабільність і активність олигомерних ферментів // *Биохимия.* — 1998. — Т. 63, № 3. — С. 360–369.
  11. *Marshall J. J.* Preparation and characterization of a dextran-amylase conjugate // *Carbohydr. Res.* — 1976. — V. 49. — P. 389–398.
  12. *Кукушкіна А. Н., Деркач С. Р., Ужинов Б. М. і др.* Взаємодія білого сывороточного альбуміна з катіонними поверхностно-активними речовинами по даним флуоресценції // *Изв. КГТУ.* — 2008. — № 13. — С. 59–62.

#### ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ ХІМІЧНОЇ МОДИФІКАЦІЇ ДЛЯ СТАБІЛІЗАЦІЇ ГРИБНИХ ГЛІКОЗИДАЗ

*Н. В. Борзова  
Л. Д. Варбанець*

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

*E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua*

Актуальним завданням сучасної прикладної ензимології, зокрема інженерії ензимів, є підвищення їхньої стабільності в різних, часто екстремальних, умовах реакційного середовища.

Порівняльне вивчення термостабільності нативних та модифікованих різними методами  $\alpha$ -галактозидаз із трьох грибових продуцентів — *Aspergillus niger*, *Penicillium canescens* і *Cladosporium cladosporioides* свідчить про те, що обробка ензимів целюлозою, декстранами Т500 і Т20, а також поліетиленгліколями 6 000 і 1 500 призводить до їх термостабілізації при 55 і 60 °С. Ефективним виявився також підхід, заснований на гідрофобній модифікації  $\alpha$ -галактозидаз ацилюванням аміногруп лізину та гліцину 2,6-діамінопімеліновою кислотою, янтарним ангідридом і гліцином. У результаті таких взаємодій термостабільність  $\alpha$ -галактозидаз було підвищено в 1,5–5 разів.

**Ключові слова:**  $\alpha$ -галактозидази *Aspergillus niger*, *Penicillium canescens*, *Cladosporium cladosporioides*, термостабілізація, хімічна модифікація ензимів.

#### USE OF CHEMICAL MODIFICATION METHODS FOR STABILIZATION OF FUNGAL GLYCOSIDASES

*N. V. Borzova  
L. D. Varbanets*

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

*E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua*

Urgent task of the modern applied enzymology, in particular enzyme engineering technique, is increasing of enzyme stability in different, often extreme, conditions of the reaction medium. Comparative study of thermostability of  $\alpha$ -galactosidases native and modified by various methods out of three fungal producers — *Aspergillus niger*, *Penicillium canescens* and *Cladosporium cladosporioides* indicated that treatment with cellulose, dextrans T500, T20 and also 6 000 and 1 500 PEG stabilized the enzymes at 55 °C and 60 °C. An approach based on hydrophobic modification of enzymes by acylation of aminogroups of lysine and glycine with 2,6-diaminoipimelic acid and glycine appeared to be effective. As a result of such interaction thermostability of  $\alpha$ -galactosidase was increased in 1,5–5 times.

**Key words:**  $\alpha$ -galactosidases *Aspergillus niger*, *Penicillium canescens*, *Cladosporium cladosporioides*, thermal stabilization, chemical modification of enzymes.