

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГИСТИДИНА В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ ЛИПАЗЫ I *RHIZOPUS ORYZAE* 1403

Определены рК функциональных групп Липазы I – рК₁=5,2 и рК₂=6,9. Значение рК в щелочной зоне подтвердилось при фотоокислении липазы. Модификация липазы DEP показала увеличение светопоглощения при 242 нм, восстановление активности гидроксиламином. Порядок реакции инактивации равнялся 1,05. V_{max} для нативного фермента составила 4,44 мМ·мин⁻¹·мг⁻¹, после модификации 1,84; K_M практически не изменилась – 786 и 803 мМ соответственно.

Ключевые слова: липаза, *Rhizopus*, гистидин.

Липазы (КФ 3.1.1.3) катализируют гидролиз сложноэфирных связей в триацилглицеринах, а в микроводных условиях – реакции синтеза. Проведены многочисленные исследования по расшифровке строения активного центра микробных липаз, особенностей механизма их действия, поверхностной активации. Для этого используются методы химической модификации [1, 2, 3], сайт-направленного мутагенеза [4, 5], молекулярного моделирования [6, 7, 8]. Установлено, что большинство липолитических ферментов действуют как сериновые гидролазы с триадой Ser-Gis-Asp в активном центре [9, 10, 11, 12, 13].

Липолитический комплекс *Rhizopus oryzae* 1403 обладает 1,3-позиционной специфичностью и высокой трансферазной активностью [14]. Поэтому представляет большой практический интерес. В данной работе представлены исследования по идентификации гистидина в активном центре одной изоформы липазы этого продуцента – Липазы I.

Методика

В работе использовали изофермент липазы *Rhizopus oryzae* 1403, полученный фракционированием ацетоносажденного препарата с помощью гель-фильтрации на G-150 и последующей хроматографией на ДЕАЕ-52. Гомогенность фермента подтверждена повторной гель-фильтрацией и электрофорезом. Продуцент получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов; диэтилпиروкарбонат (DEP) – Sigma Chemical Co (США); другие реагенты отечественного производства марки х.ч.

В качестве субстрата использован трибутирин. Для определения кинетических характеристик гидролиза регистрировали накопле-

ние свободных жирных кислот (СЖК) методом рН-статирования [15]. Начальную скорость рассчитывали по тангенсу угла наклона кинетических кривых [16]. Исследования проводились в диапазоне концентраций фермента от 10 до 150 мкг/см³, дающем прямолинейную зависимость от значений начальных скоростей.

При условии начальной скорости реакцию гидролиза трибутирина можно изобразить в виде следующей схемы превращений:



Эффективную константу k_2 рассчитывали из уравнения Михаэлиса

$$x_0 = k_2 \cdot C_{S,0} \cdot C_{E,0} / (K_M + C_{S,0}) \quad (2)$$

из зависимости ($C_{E,0}/x_0, 1/C_{S,0}$) путем подбора в ходе интегральной обработки экспериментальных данных. Максимальную скорость гидролиза V_{max} и константу Михаэлиса K_M находили методом двойных обратных координат Лайнуивера-Берка [16].

Фотоокисление липазы проводили на свету с использованием лампы накаливания на расстоянии 10 см в присутствии 5·10⁻⁶ М раствора метиленовой сини [17]. Контролем служила проба с той же концентрацией фотосенсибилизатора, выдерживаемая в темноте. В отсутствие фотосенсибилизатора на свету фермент не терял активность в течение 4 ч.

Модификацию диэтилпирокарбонатом (DEP) проводили, рассчитывая, чтобы в реакционной смеси концентрация спирта составляла не более 1,25 % (такая концентрация спирта не влияла на активность фермента). Спектры поглощения модифицированного фермента регистрировали на СФ-46 против раствора нативного фермента в буфере. Испытания осуществляли при температуре 20 °С и рН 6,5 и кон-

центрациях DEP (M): $2,5 \cdot 10^{-5}$; $5,0 \cdot 10^{-5}$; $2,5 \cdot 10^{-4}$; $5,0 \cdot 10^{-4}$; $2,5 \cdot 10^{-3}$. Концентрация субстрата составляла 10 мМ.

Результаты и их обсуждение

Определение рК функциональных групп активного центра Липазы I.

Значения рК групп, участвующих в акте катализа, определяется из предположения, что фермент активен только в одном состоянии ионизации, и активность будет в значительной мере зависеть от ионизации двух особых групп в активном центре или вблизи него.

Нами были проведены исследования начальной скорости реакции гидролиза трибутирина при различных значениях рН при концентрации субстрата, далекой от состояния насыщения – 2 мМ (рис 1, а). По логарифмической зависимости эффективных констант гидролиза k_2 от рН (рис. 1, б) были определены рК Липазы

I – $pK_1=5,2$ и $pK_2=6,9$. Первое значение близко карбоксильной группе ($pK=3,0-4,7$), второе – рК имидазола гистидина ($pK=5,6-7,0$) [18].

Идентификация имидазольной группы

Липазы I фотоокислением.

Фотоинактивация липазы в присутствии метиленовой сини возрастала с уменьшением концентрации ионов водорода в среде (рис. 2). Подобные данные получены для L-треониндегидратазы [17]. Фотоокислению в ферментах подвергаются также остатки тирозина, триптофана, метионина и цистеина, но в отличие от последних, гистидин выполняет роль «ловушки» протонов, а таким свойством ни фенольное кольцо тирозина, ни индольная группа триптофана не обладают [19]. Графическая обработка данных в координатах $\ln v$ привела к спрямлению кривых инактивации (рис. 2, б). Из этого следует, что процесс фотоокисления липазы подчиняется реакции псевдопервого порядка и

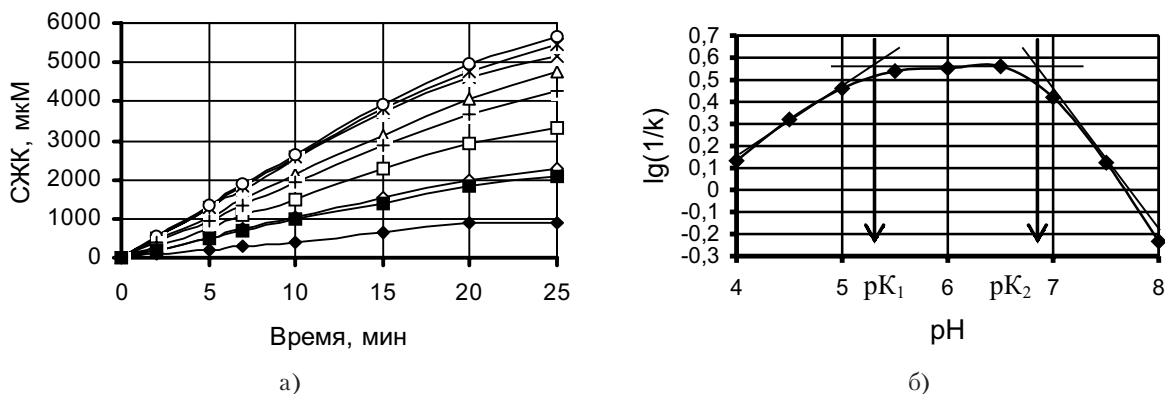


Рисунок 1. (а) Кинетические кривые процесса ферментативного гидролиза трибутирина при температуре 35 °С и различных значениях рН: (\diamond) 4,0; (\square) 4,5; (Δ) 5,0; (\times) 5,5; (Ж) 6,0; (\circ) 6,5; ($+$) 7,0; (\blacksquare) 7,5; (\blacklozenge) 8,0; (б) определение рК функциональных групп Липазы I.

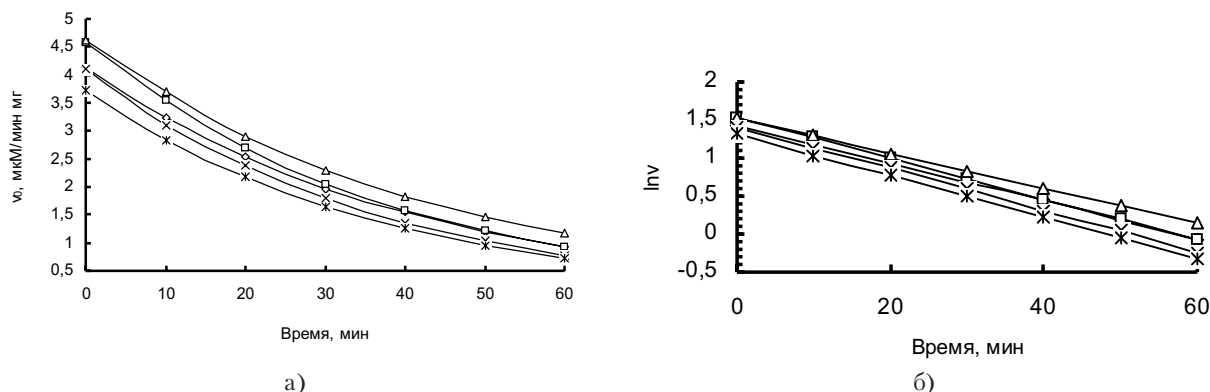


Рисунок 2. Зависимость скорости ферментативной реакции при фотоокислении Липазы I от значения рН: (Δ) – 6,5; (\square) – 6,0; (\diamond) – 5,5; (\times) – 7,0; (Ж) – 7,5; (а) временные кривые скорости гидролиза субстрата при различных значениях рН; (б) те же кривые в полулогарифмических координатах для определения констант скоростей фотоинактивации.

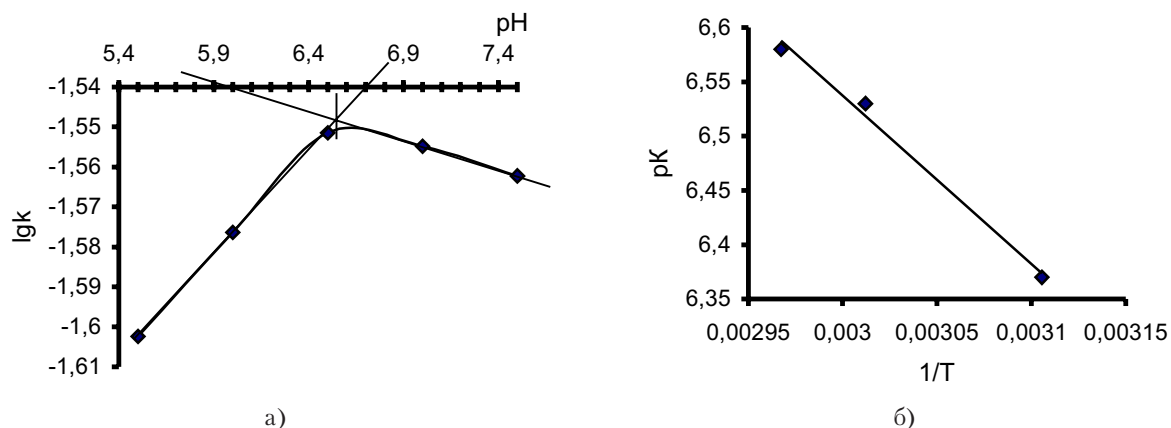


Рисунок 3. Определение рК фотоокисляемой группы Липазы I (а) и значения её теплоты ионизации (б).

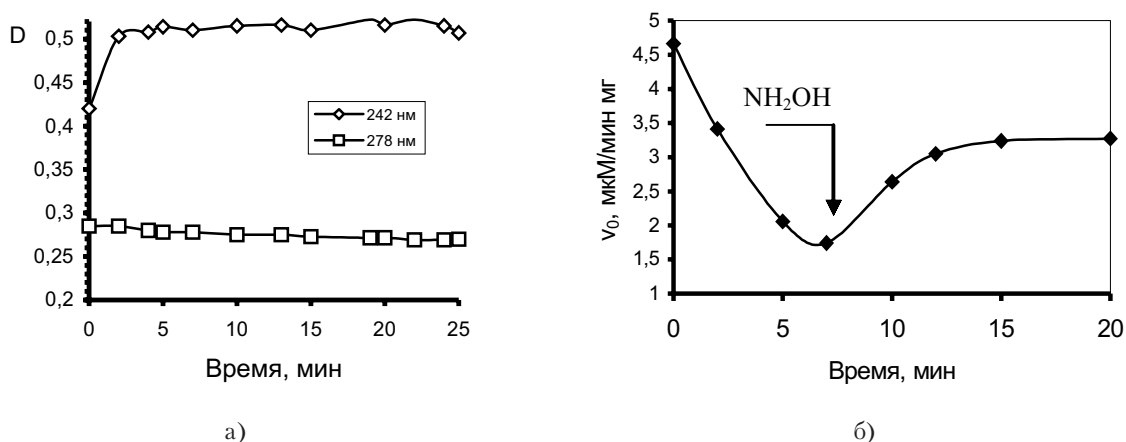


Рисунок 4. (а) Спектры поглощения модифицированной DEP ($2,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$) Липазы I при 242 нм и 278 нм; (б) инактивация липазы под действием DEP ($5,0 \cdot 10^{-4} \text{M}$) с последующей реактивацией 0,5 M NH_2OH .

по тангенсу угла наклона прямых можно установить константы ингибирования k .

Полученные расчетным путем константы скоростей процесса фотоинактивации при разных значениях pH были использованы для определения значений рК группы, существенной для каталитической активности.

На рис. 3, а показано, что для фотоокисляемой группы значение рК равно 6,5, что близко к рК, определенной из зависимости $\lg 1/k$ от pH.

При идентификации каталитически активных групп белков определяют значения их теплот ионизации [20], которые могут служить дополнительным её подтверждением. Исследования фотоинактивации Липазы I при различных температурах – 35, 25, 40 °C дали соответствующие значения рК. Зависимость рК от $1/T$ показана на рис. 3, б.

Теплоту ионизации ДН рассчитывали из уравнения 3 по углу наклона графика (рК, $1/T$)

$$DH = 2.303 \cdot R \cdot d(pK) / d(1/T) \quad (3)$$

Найденное значение теплоты ионизации – 29,1 кДж·моль⁻¹ соответствовало теплоте ионизации имидазола гистидина (28,8–31,4 кДж·моль⁻¹) [21].

Инактивация ферментов в процессе фотоокисления в зависимости от температуры и pH может происходить как вследствие разрушения остатков гистидина, так и нарушения общей молекулярной структуры белка [19, 20]. Поэтому для выяснения роли остатков имидазола гистидина в функционировании Липазы I её модифицировали диэтилпиروкарбонатом (DEP).

Модификация Липазы I диэтилпирокарбонатом.

Повышение светопоглощения раствора фермента с DEP при 242 нм и крайне незначи-

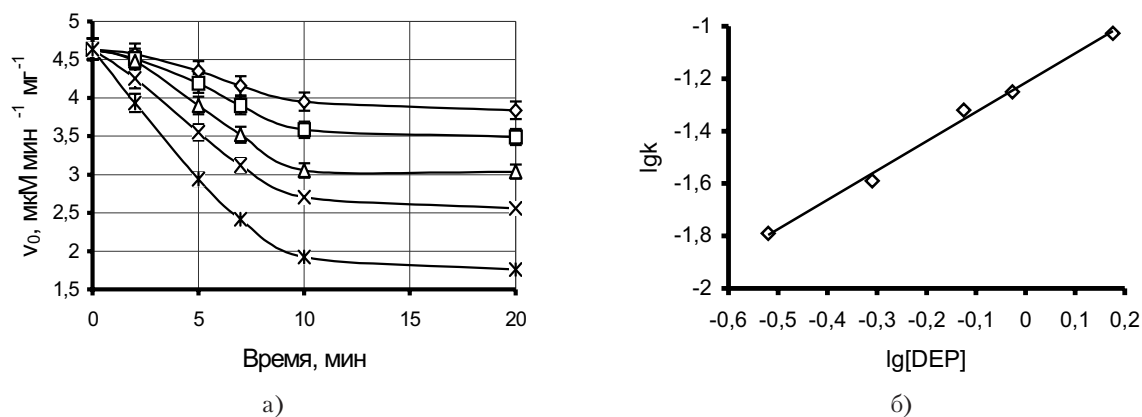


Рисунок 5. Динамика инактивации липазы I DEP: (а) временные кривые остаточной активности при концентрациях DEP (М) – (\diamond) $2,5 \cdot 10^{-5}$; (\square) $5 \cdot 10^{-5}$; (Δ) $2,5 \cdot 10^{-4}$; (\times) $5 \cdot 10^{-4}$; (\ast) $2,5 \cdot 10^{-3}$; (б) определение порядка реакции.

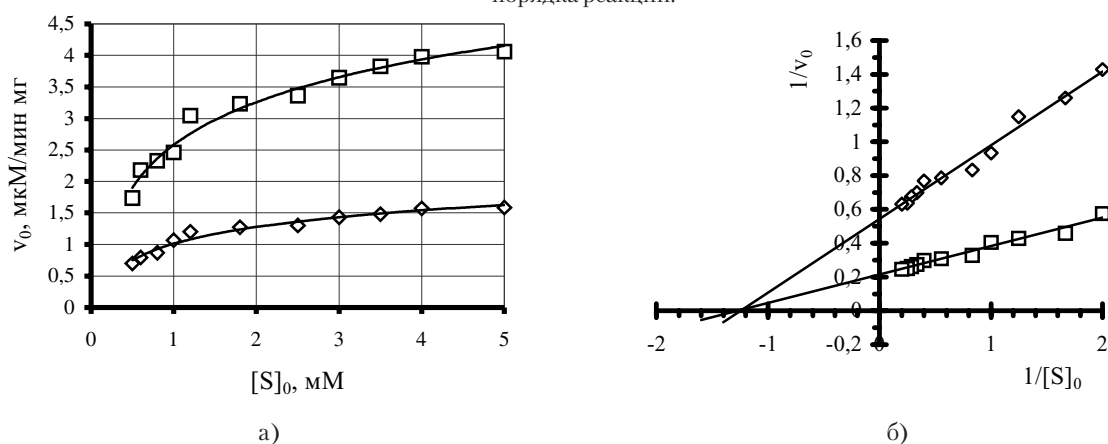


Рисунок 6. Зависимость начальной скорости реакции гидролиза трибутирина нативной (\square) и модифицированной DEP (\diamond) липазой от концентрации субстрата: (а) данные представлены в координатах x от $[S]$; (б) определение кинетических параметров процесса в координатах $1/x-1/[S]$.

тельное уменьшение его при 278 нм (рис. 4, а) указывало на взаимодействие DEP с гистидином, но не с тирозином. Восстановление активности Липазы I при добавлении гидроксилана исключило возможность взаимодействия с SH- и NH_2 - группами (рис. 4, б).

Расчеты констант инактивации фермента при различных концентрациях ингибитора и преобразование значений в полулוגарифмических координатах позволило установить, что порядок реакции, определенный по тангенсу угла наклона прямой ($\text{tg } \alpha$), равен 1,05 (рис. 5), что указывает на участие в реакции не более одного остатка гистидина.

Для выяснения механизма инактивации Липазы I под действием DEP нами были определены кинетические характеристики этого процесса. В эксперименте использовалась концентрация DEP $5,0 \cdot 10^{-4}$ М, время выдерживания фермента с ингибитором – 5 мин. Как пока-

зали результаты, под действием DEP уменьшается только V_{max} (рис. 6).

Максимальная скорость для нативного фермента составила $4,44 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, после модификации стала равной $1,84 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Константа Михаэлиса практически не изменилась – 786 мМ и 803 мМ соответственно. Из этого можно сделать вывод о том, что гистидин оказывает влияние только на диссоциацию фермент-субстратного комплекса, но не на сродство фермента к субстрату.

Таким образом, проведенные исследования показали, что Липаза I *Rhizopus oryzae* 1403 имеет остаток гистидина в активном центре. В панкреатической карбоксиэстерагидролазе гистидин был идентифицирован с помощью этоксиформольного ангидрида – остаточная активность составляла 40–65,8 % [3], а в липаза/ацилгидролазе из *Aeromonas hydrophila* – путем замены His291 на Asp – активность полностью терялась [10].

Список использованной литературы:

1. Dufour C., Semeriva M., Dessnuelle P. The role of carboxyl groups in the activity of pancreatic lipase // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1973. – V. 327. – P. 101–113.
2. Küller W., Kolattukudy P. E. Mechanism of action of cutinase: chemical modification of the catalytic triad characteristic for serine hydrolases // *Biochemistry.* – 1982. – V. 21. – P. 3083–3090.
3. Lombardo D. Catalytic properties of modified human pancreatic carboxylic-ester hydrolase // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1982. – V. 700. P. 75–80.
4. Jдгер S., Demleither G., Gцtz F. Lipase of *Staphylococcus hyicus*: analysis of the catalytic triad by site-directed mutagenesis // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1992. – V. 100. – P. 249–254.
5. Kwon S. J., Han J. I., Rhee J. S. Production and in situ separation of mono- or diacylglycerol catalyzed by lipases in n-hexane // *Enzyme Microb. Technol.* – 1995. – V. 17, № 8. – P. 700–704.
6. Derewenda U., Swenson L., Green R. et al. Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi // *Protein Engineering.* – 1994. – V. 7, № 4. – P. 551–557.
7. Kazlauskas R. J. Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties // *Trends Biotechnol.* – 1994. – V. 12. – P. 464–472.
8. Vujaklija D., Abramic M., Lescic I. et al. *Streptomyces rimosus* GDS (L) lipase: Production, heterologous overexpression and structure-stability relationship // *Food Technol. Biotechnol.* – 2003. – V. 41, № 1. – P. 89–93.
9. Benjamin S., Pandey A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation // *Braz. Arch. Biol. a Technol.* – 2001. – V. 44, № 2. – P. 213–221.
10. Brumlik M. J., Buckley J. T. Identification of the catalytic triad of the lipase/acyltransferase from *Aeromonas hydrophila* // *J. Bacteriology.* – 1996. – V. 178, № 7. – P. 2060–2064.
11. Herrgard S., Gibas C. J., Subramaniam S. Role of an electrostatic network of residues in the enzymatic action of the *Rhizomucor miehei* lipase family // *Biochemistry.* – 2000. – V. 39, № 11. – P. 2921–2930.
12. Van Pouderoyen G., Eggert T., Jaeger K.-E., Dijkstra B. W. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: A minimal α/α -hydrolase fold enzyme // *J. Mol. Biol.* – 2001. – V. 309, № 1. – P. 215–226.
13. Yadav R. P., K. S., Gupta R., Davidson W. S. Rajendra Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus* // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 1998. – V. 28, № 3. – P. 243–249
14. Шеламова С. А. Биотехнологические основы конверсии триглицеридов. – Воронеж, 2008. – 145 с.
15. Петрова Л. Л., Казанина Г. А., Селезнева А. А. Применение рН-статного метода для изучения ферментивного действия липазы *Penicillium sp.* // *Прикл. биохим. и микроб.* – 1977. – Т. 13, № 5. – С. 758.
16. Варфоломеев С. Д., Гуревич К. Г. Биокинетика: Практический курс. – М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. – 720 с.
17. Ковалева С. В., Дорожко А. И., Каган З. С. Фотоокисление и модификация диэтилпиноксикарбонатом «биосинтетической» L-треониндегидратазы из пивных дрожжей *Sassharomyces carlsbergensis* // *Биохимия.* – 1984. – Т. 49, № 8. – С. 1253–1262.
18. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика; пер. с англ. В. Л. Друцы и Л. Н. Королевой. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
19. Буник В. И., Гомазкова В. С. О функциональной роли гистидиновых остатков б-кетоглутарат-дегидрогеназы // *Биохимия.* – 1987. – Т. 52. – С. 1235–1247.
20. Лосева Л. П., Бендианишвили М. В., Шатилов В. Р. и др. Роль остатков гистидина в конститутивной НАД(Ф)-глутаматдегидрогеназе *Chorella pirenoidosa* // *Биохимия.* – 1986. – Т. 51. – С. 840–849.
21. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: в 3-х т.; пер. с 3-го англ. изд. Л. Д. Гинодмана и М. И. Левянт; под ред. В. К. Антонова и А. Е. Браунштейна – М.: Мир, 1982. – 1120 с.