

НЕКОТОРЫЕ КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПАЗЫ I *RHIZOPUS ORYZAE* 1403

Липаза I ингибировалась *n*-ХМБ – V_{\max} не изменялась, а K_M увеличивалась в 1,5 раза. PMSF вызывал снижение V_{\max} на 63,5 % и увеличение K_M на 51 %. установлены индивидуальные кинетические константы ингибирования аналогами субстратов – *n*-гексил-этил-хлорофосфонатом и додецилсульфонатом, соответственно: $k_2=4,2 \text{ с}^{-1}$ и $k_3=7,6$; $k_2=18,5 \text{ с}^{-1}$ и $k_3=3,2$. Это доказывает наличие двух стадий при гидролизе – ацилирования и деацилирования.

Ключевые слова: липаза, *Rhizopus*, серин.

К настоящему времени расшифрован сиквенс либо аминокислот, либо нуклеотидов ДНК более чем 2000 липаз. Анализ идентичности аминокислотной последовательности липаз *Rh. javanicus*, *Rh. niveus*, *Rh. delemar* позволил обнаружить 54 % сходство с липазой из *Rhizomucor miehei* [1, 2]. Сравнение трехмерных структур липаз человеческой поджелудочной железы и гриба *Rhizomucor miehei* выявило каталитическую триаду Ser-Asp-His, подобную сериновым протеазам. Впоследствии рентгеноструктурный анализ липаз *Pseudomonas glumae*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Penicillium camembertii*, *Candida antarctica*, и кутиназы *Fusarium solani pisi* указал на их схожее каталитическое строение [3–6].

В данной работе приводятся исследования модификации SH-групп и серина с целью выяснения их роли в каталитическом действии Липазы I *Rhizopus oryzae* 1403.

Методика

В работе использовали *n*-хлормеркурибензоат (*n*-ХМБ), фенолметансульфонилфторид (PMSF), *n*-гексил-этил-хлорофосфонат и додецилсульфонат, полученные из Merck (Германия). Другие реагенты были отечественного производства марки х.ч. В качестве субстрата использовали трибутирин. Модификацию фермента проводили при температуре 35 °С и pH 6,5 (если не указано).

Результаты и их обсуждение

Модификация Липазы I n-хлормеркурибензоатом.

Органические соединения ртути являются специфичными реагентами для определения и изучения функции сульфгидрильных групп. Некоторыми исследователями установлено, что

SH-группы остатков цистеина играют существенную роль в конформационных изменениях молекулы липазы, а также влияют на связывание субстрата и кофакторов [7, 8]. Ингибирующее действие *n*-ХМБ проявляется по-разному. Установлено, что липазы молока и семян клецвины полностью им инактивируются, что, по мнению авторов, указывает на тиоловую природу этих ферментов [9, 10]. Частичная потеря активности под действием ингибитора наблюдалась у панкреатической липазы свиньи и грибной из *Puccinia graminis* [11]. Это объяснили влиянием стерических эффектов на каталитическую активность за счет блокирования сульфгидрильных групп, находящихся вблизи активного центра фермента.

В литературе имеются данные о липазе, из желудочной ткани, обработка которой дитионитробензолом приводила к её инактивации [12]. Был изучен механизм ингибирования эндолипазы из *Rhizopus delemar* ионами тяжелых металлов Hg^{2+} , Pb^{2+} , блокирующими поверхностные SH-группы фермента. В ряде исследований *n*-ХМБ выступал как в качестве ингибитора, так и активатора олигомерных ферментов [13].

Нами исследовано влияние различных концентраций *n*-ХМБ – $5 \cdot 10^{-4}$, $2,5 \cdot 10^{-4}$, $2,5 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-5}$ М на активность липазы. На рис. 1 показано, что модификатор приводит к потере каталитической активности липазы, и тем в большей степени, чем выше его концентрация. За 15 мин инкубации при концентрации ингибитора $5 \cdot 10^{-4}$ М скорость ферментативной реакции снижалась на 36 %.

Для выяснения природы инактивации фермента под воздействием *n*-ХМБ нами была исследована кинетика этого процесса. Результаты испытаний представлены на рис. 2 (а, б). Графическая обработка данных в координатах Лайнуивера-Берка показала, что V_{\max} не изменяет-

ся, а K_M увеличивается в 1,5 раза. Это говорит о том, что SH-группы Липазы I не задействованы в самом акте катализа, но влияют на сродство фермента к субстрату, а также могут участвовать в поддержании активной конформации молекулы.

Модификация Липазы I фенилметансульфонилфторидом.

Многие микробные липазы являются сериновыми, так как содержат реакционноспособный остаток серина в активном центре [14, 15]. Такие ферменты обычно ингибируются рядом фосфоорганических соединений.

Исследования ингибирования липазы *Aspergillus terreus* в присутствии 100 мМ 3,4-дихлоризокумарина показали уменьшение активности на 40 %, а *n*-нитрофенилфосфата – 98 %, что свидетельствовало о принадлежности фермента к сериновым гидролазам [15].

Активность липазы *Neuspora sp.* полностью подавлялась диизопропилфторфосфатом (ДФФ) [16]. Подобные результаты наблюдали при действии фенилметилсульфонилфторида (PMSF) и 3,4-дихлоризокумарина на изоферменты липазы *Candida rugosa* [17].

Нами были проведены исследования по влиянию различных концентраций PMSF $1 \cdot 10^{-4}$; $2,5 \cdot 10^{-3}$; $5 \cdot 10^{-3}$ М, на активность Липазы I (рис. 3). Ингибирование проводили при температуре 20 °С, pH 6,5, концентрация фермента в реакционной смеси составляла 2,21 мМ. Активность определяли при содержании субстрата 10 мМ.

В результате эксперимента было установлено, что с увеличением концентрации PMSF активность фермента снижается более чем на 40 % за 5 мин и более чем на 85 % за 15 мин инкубации при максимальной концентрации реагента $5 \cdot 10^{-3}$ М. Для выяснения природы инактивации фермента под воздействием PMSF нами была исследована кинетика этого процесса. Результаты испытаний представлены на рис. 4 (а, б). Под дей-

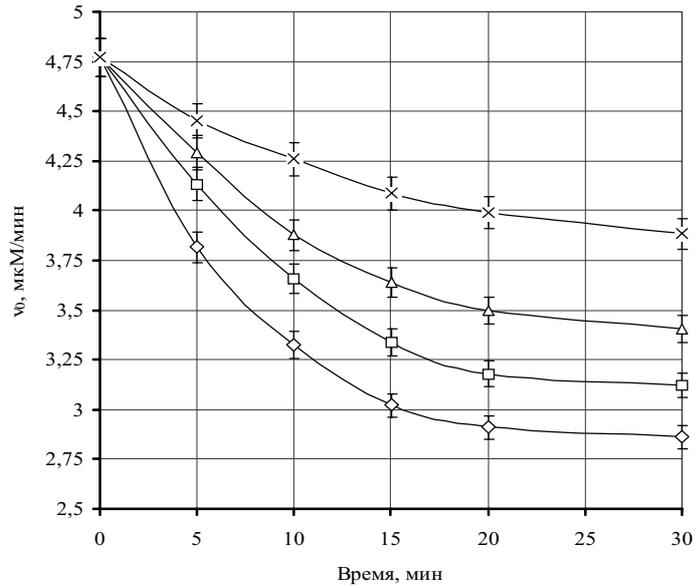


Рисунок 1. Зависимость ферментативной активности от концентрации *n*-ХМБ и времени воздействия; концентрация *n*-ХМБ: (x) $1 \cdot 10^{-3}$; (Δ) $2,5 \cdot 10^{-5}$; (□) $2,5 \cdot 10^{-4}$; (◇) $5 \cdot 10^{-4}$ М.

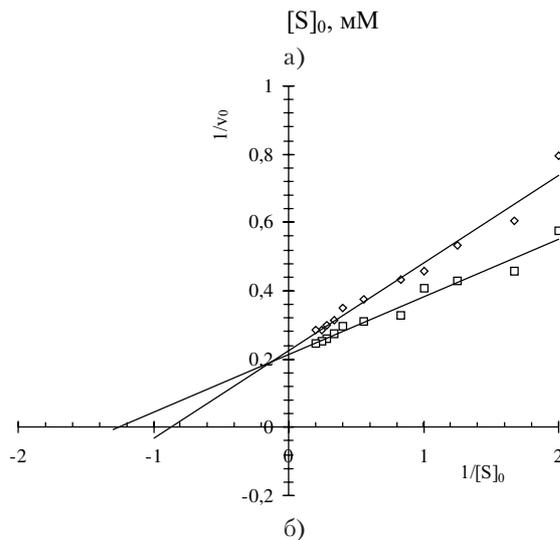
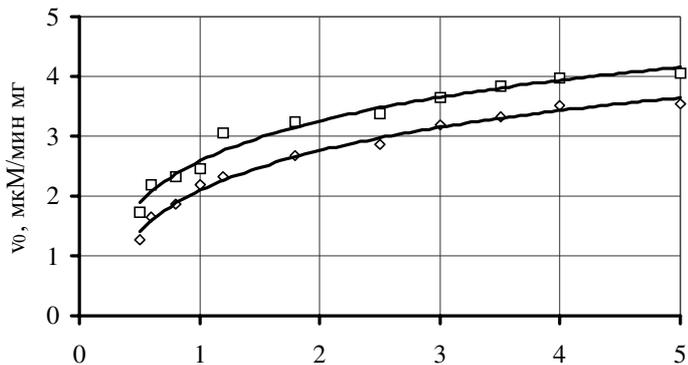


Рисунок 2. Кинетика инактивации липазы *Rhizopus oryzae* 1403 под действием $5 \cdot 10^{-4}$ М *n*-ХМБ: (а) зависимость x от концентрации субстрата: нативная (□) и модифицированная (◇) *n*-ХМБ липаза; (б) графическое определение V_{max} и K_M .

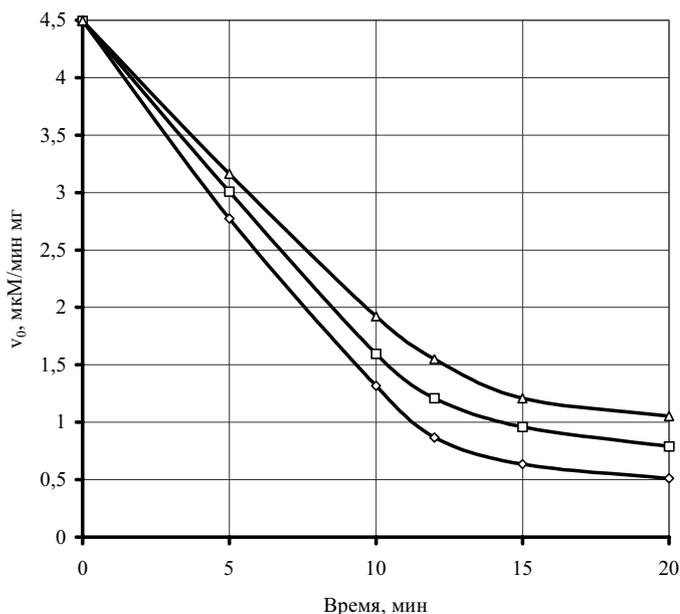


Рисунок 3. Зависимость активности Липазы I от концентрации PMSF и времени инкубации. Концентрация PMSF: (Δ) 1·10⁻⁴; (□) 2,5·10⁻³; (◇) 5·10⁻³ М.

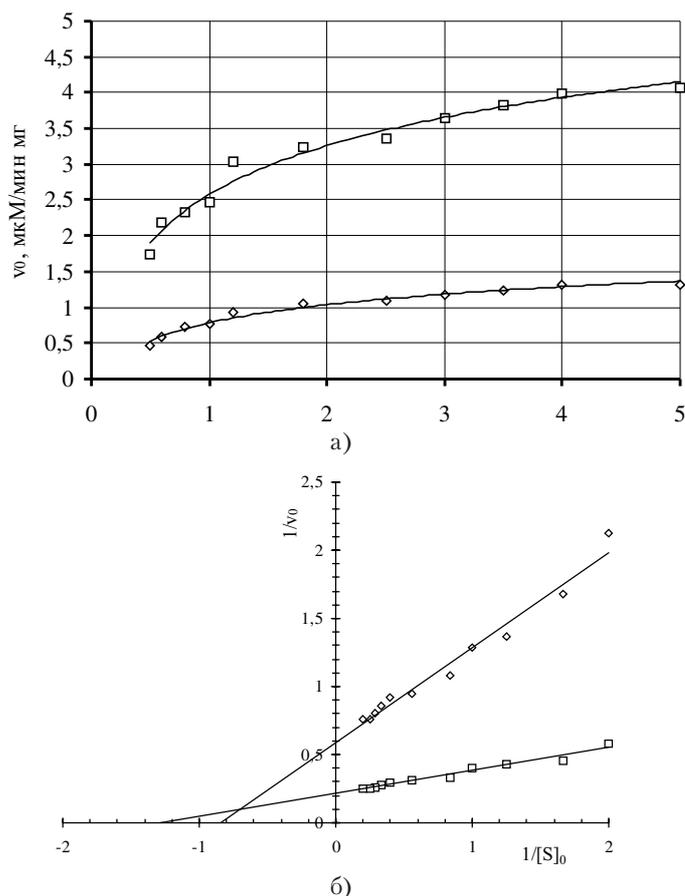


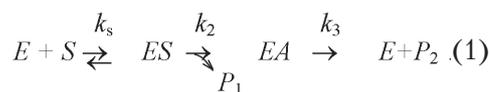
Рисунок 4. Зависимость начальной скорости реакции гидролиза трибутирина нативной (□) и модифицированной PMSF (◇) липазой от концентрации субстрата: (а) данные представлены в координатах (x_0 , $[S]_0$); (б) определение кинетических параметров процесса в координатах ($1/x_0$, $1/[S]_0$).

ствием ингибитора V_{max} снижалась на 63,5 %, а K_M увеличивалась на 51 %. Это говорит о том, что фосфоорганическое соединение блокирует активный центр фермента, и одновременно конформация молекулы становится неблагоприятной для связывания с субстратом.

Роль остатка серина в каталитической активности Липазы I.

Для исследования роли остатка серина в катализе была проведена модификация липазы ингибиторами, которые являются аналогами субстратов – *n*-гексил-этил-хлорофосфонатом и додецилсульфонатом и проведен кинетический анализ ингибирования (рис. 5).

Согласно трехстадийному механизму [18], кинетика ферментативного гидролиза триглицеридов может быть представлена схемой



Липаза сначала связывается с триглицеридом в реакции с быстро наступающим равновесием. Затем освобождается диглицерид – продукт P_1 и образуется ацилферментное промежуточное соединение с константой k_2 . Далее вода атакует ацил-фермент, в результате чего липаза освобождается и выделяется жирная кислота с константой скорости псевдопервого порядка k_3 . Так как концентрация воды превышает концентрацию триглицерида и $k_3 \gg k_4$ для этого механизма, скорость можно выразить уравнением Михаэлиса

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Максимальная скорость и константа Михаэлиса связаны со значениями индивидуальных констант схемы (1) соотношениями

$$V_{max} = \frac{[E_0] \cdot k_2 \cdot k_3}{k_2 + k_3}$$

$$K_M = K_S \frac{k_3}{k_2 + k_3}$$

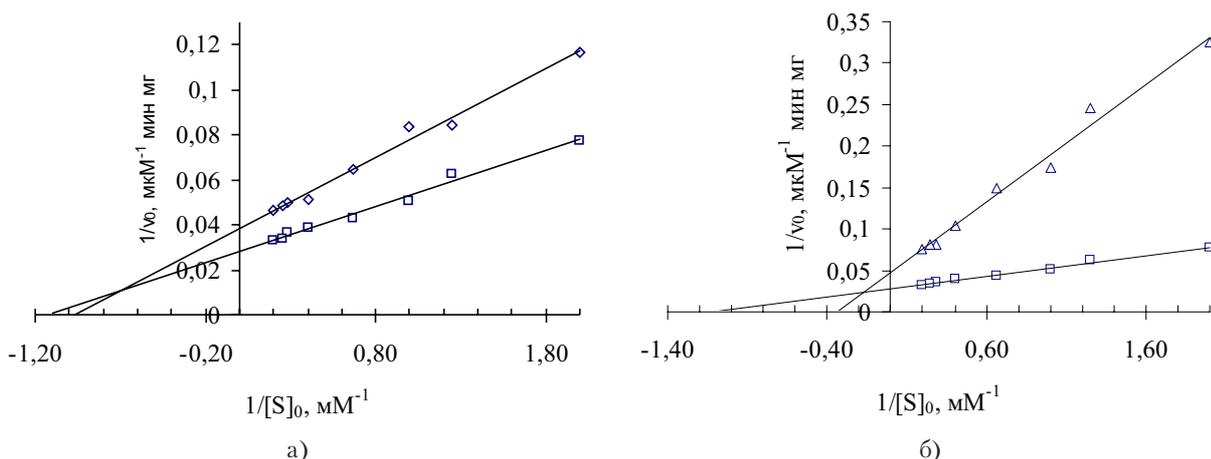


Рисунок 5. Кинетические зависимости ингибирования Липазы I (а) *n*-гексил-этил-хлорофосфонатом и (б) додецилсульфонатом в двойных обратных координатах; (□) нативный фермент; (◇), (Δ) с ингибиторами.

Индивидуальные константы k_2 и k_3 были рассчитаны из соотношений

$$k_{cat} = \frac{k_2 - k_3}{k_2 + k_3}, \quad (2)$$

$$K_M = K_S \frac{k_3}{k_2 + k_3}, \quad (3)$$

Для фосфоната они были равны: $k_2=4,2 \text{ c}^{-1}$ и $k_3=7,6$, то есть в данном случае ингибировалась стадия ацилирования. Для сульфоната соотношение между константами было обратным – $k_2=18,5 \text{ c}^{-1}$ и $k_3=3,2$, что свидетельствует о подавлении стадии деацилирования.

Таким образом, установлено, что катализ гидролиза сложноэфирной связи Липазой I проходит через две стадии – ацилирование и деацилирование.

Список использованной литературы:

1. 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.
2. Kohno M., Kugimiya W., Hashimoto Y., Morita Y. Purification, characterization, and crystallization of two types of lipase from *Rhizopus niveus* // Bioici. Statech. Blochem. – 1994. – V. 58, № 6. – P. 1007–1012.
3. Martinez C., Geus P. D., Lauwereys M. et al. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent // Nature. – 1992. – V. 356. – P. 615–618.
4. Kцller 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.
5. Ruiz B., Farres A., Langley E. et al. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Penicillium candidum* // Lipids. – 2001. – V. 36, № 3. – P. 283–289.
6. Uvarani G., Jaganatan L., Shridas P., Boopathy R. Purification and characterization of lipase from *Rhizomucor miehei* // Journal of Scientific & Industrial Research. – 1998. – V. 57. – P. 607–610.
7. Торчинский Ю. М. Сера в белках. – М.: Наука, 1977. – 302 с.
8. Defay T., Cohen F. Protein modelling. Molecular Biology and Biotechnology. A comprehensive desk reference. – New York. – 1995. – P. 757–762.
9. Richardson I. S. The anatomy and taxonomy of protein structure // Adv. Prot. Chem. – 1981. – V. 34. – P. 167–239.
10. Thannhauser T. W., Konishi Y., Scheraga H. A. Sensitive quantitative analysis of disulfide bond in polypeptides and proteins // Anal. Biochem. – 1984. – V. 138, № 1. – P. 181–188.
11. Брокерхоф К., Дженсен Р. Липолитические ферменты. – М.: Мир, 1978. – 396 с.
12. Moreau M., Gargouri X. Importance of sulfhydryl group for rabbit gastric lipase activity // J. Mol. Biol. – 1988. – V. 98, № 9. – P. 1050–1054.
13. Rosenstein R., Gotz F. *Staphylococcus* lipases: Biochemical and molecular characterization // Biochimie. – 2000. – V. 82, № 11. – P. 1005–1014.
14. Ogiso T., Sugiura M. Studies on Bile-sensitive Lipase. Purification and Properties of Lipase from *Mucor javanicus* // Chem. Pharm. Bull. – 1969. – V. 17, № 5. – P. 1025–1033.
15. Yadav R. P., Rajendra K. S., Gupta R., Davidson W. S. Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus* // Biotechnol. Appl. Biochem. – 1998. – V. 28, № 3. – P. 243–249.
16. Lin S.-F., Lee J.-C., Chian C.-H. Purification and characterization of a lipase from *Neurospora sp.* // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1996. – V. 73, № 6. – P. 731–741.
17. 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
18. Клесов А. А., Березин И. В. Ферментативный катализ. – М.: Изд-во МГУ, 1980. – Ч. 1. – 264 с.