

Н.В. Борзова, Л.Д. Варбанец

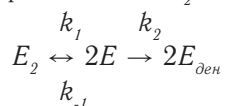
Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП ДО 3680, Украина,
тел.: +38 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ α -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ *CLADOSPORIUM* *CLADOSPORIOIDES*

Исследована термостабильность α -галактозидазы Cladosporium cladosporioides в диапазоне температур 55–60 °С. Рассчитаны некоторые термодинамические параметры и предложен механизм термоинактивации фермента. Энергия активации перехода отдельной субъединицы α -галактозидазы из нативного состояния в денатурированный составила 165 кДж/моль. Показана стабилизация молекулы фермента в присутствии бычьего сывороточного альбумина (на 19%), глицерина (на 30–40%), галактозы (на 15%), мелибиозы, раффинозы и стахиозы (45%, 21% и 15%).

К л ю ч е в ы е с л о в а : α -галактозидаза, Cladosporium cladosporioides, термоинактивация.

В настоящее время имеется обширный материал по кинетике термоинактивации олигомерных ферментов в различных условиях. Можно указать на четыре основных типа инактивации ферментов [2]. Это необратимая инактивация первого порядка, инактивация по схеме последовательных превращений первого порядка, инактивация по механизму последовательно-параллельных реакций первого порядка и диссоциативная инактивация. Последний механизм наиболее важен для олигомерных молекул, поскольку в этом процессе обратимые стадии диссоциации предшествуют кинетически необратимому изменению их продуктов. Примером такого рода является распад димерного белка E_2 по кинетической схеме:



E — мономерный белок, способный к обратной ренатурации, а $E_{ден}$ — продукт необратимого изменения E . Белок $E_{ден}$ уже не способен к ассоциации с образованием функционально активного комплекса E_2 , например, вследствие нарушения свойств контактного участка белковой глобулы или существенных структурных изменений.

Зависимость кинетических кривых диссоциативной термоинактивации фермента по двустадийному механизму при $[E]_0 = const$ от температуры объясняется рядом факторов: различием температурных коэффициентов процессов диссоциации и денатурации и резким увеличением с ростом температуры величины $K_{дисс}$. Таким образом, поиск путей стабилизации олигомерного белка состоит в решении задачи сохранения интактности его четвертичной структуры путем подавления первичных



обратимых стадий термоинактивации. Положение точек излома и наклоны кривых в координатах кинетического уравнения первого порядка позволяют определить три элементарные кинетические константы: k_j (константа скорости диссоциации димера), $K_{дис}$ (константа равновесия диссоциации димера), $k_{ден}$ (константа скорости денатурации), где $K_{дис} = k_j/k_{-j}$. Все три параметра могут быть определены экспериментально в том случае, если данные получены для температурного интервала, который отвечает экспериментально наблюдаемому процессу диссоциации олигомера, и в области концентраций белка, соизмеримых с величиной $K_{дис}$.

Исследуемый нами фермент — α -галактозидаза *Cladosporium cladosporioides*, по нашим предварительным данным является гликозилированным гексамером [1], с молекулярной массой 400 кДа по данным гель-фильтрации, и 66 кДа — по данным SDS-ПААГ электрофореза. Данная работа посвящена изучению вопросов кинетики и термоинактивации этого олигомерного белка, с целью расширить возможные области его применения.

Материалы и методы

При исследовании процесса термоинактивации контрольную реакцию проводили при 37 °С, так как при этой температуре исследуемая α -галактозидаза *C. cladosporioides* за время реакции полностью сохраняла свою каталитическую активность. Удельная активность фермента составляла 3,6 Е/мл, K_m равнялась 0,79 мМ. Выбранные рабочие концентрации ферментов находились в пределах диапазона концентраций, где ферментативная активность прямо пропорциональна концентрации фермента $[E]_0$.

Термостатирование проводили при температурах 50–65 °С, периодически отбирая пробы (0,1 мл) для определения активности. Активность определяли по начальной скорости гидролиза *p*-нитрофенил- α -D-галактопиранозида спектрофотометрическим методом [3] при контрольной температуре и насыщающей концентрации субстрата, после чего рассчитывали начальные скорости реакций. Для реинактивации после термообработки образцы инкубировали при 40 °С от 5 до 24 часов.

Изучение кинетики и расчет констант термоинактивации проводили согласно работе Полторака и др. [2]. Для расчета эффективной константы скорости денатурации $k_{ден}$ и константы диссоциации $K_{дис}$ строили кинетические кривые термоинактивации в полулогарифмических координатах $\ln v_t/v_0$ от t , где v_0 — скорость ферментативной реакции при $t=0$. По пересечению касательных, проведенных к линейным участкам кинетической кривой определяли точку излома при $t=\tau$. По тангенсам углов наклона касательных определяли $k_{эф}$ (константы скорости диссоциации олигомера и ассоциации мономеров). Расчет $K_{дис}$ проводили по формуле:

$$K_{дис} = 4 [E_0] (v_0 - v_\tau)^2 / v_0 v_\tau,$$

где E_0 — концентрация олигомерной формы фермента в начальный момент времени, v_0 и v_τ — максимальные скорости контрольной каталитической реакции в начальный момент времени и в момент времени τ , отвечающий точке излома.

Константу скорости денатурации $k_{ден}$ определяли по формуле:

$$k_{ден} = k_{эф}(v_0 + v_\tau)/2(v_0 - v_\tau)$$



Обработку фермента глутаровым альдегидом проводили следующим образом: к 1 мл очищенного ферментного раствора (10 Е/мл) добавляли 10–50 мкл 50% глутарового альдегида и выдерживали при комнатной температуре в течение 15–60 мин, остатки реагента удаляли гель-фильтрацией на Sepharose 6В. Далее обработку проводили, как описано выше.

Углеводы (сахароза, галактоза, глюкоза, мелибиоза, раффиноза, стахиоза, трегалоза, мальтоза), сухую бычью кровь и БСА использовали в концентрации 0,5%, глицерин – 5–40%.

Результаты и их обсуждение

Как видно из рис. 1, процесс термоинактивации α -галактозидазы *C. cladosporioides* состоит из нескольких элементарных стадий, две из которых (начальную и конечную) можно оценить количественно. При построении кинетических кривых термоинактивации в полулогарифмических координатах наблюдался «излом», положение которого зависит от концентрации фермента при фиксированной температуре. Также показано, что фермент можно частично реинактивировать на начальных этапах термообработки, до «излома». Это обычная картина при наличии в системе диссоциативно-ассоциативного равновесия. Таким образом, мы предполагаем, что термоинактивация олигомерной α -галактозидазы *C. cladosporioides* при 55 и 60 °С проходит по механизму диссоциативной инактивации, а при 65 °С – необратимой инактивации первого порядка.

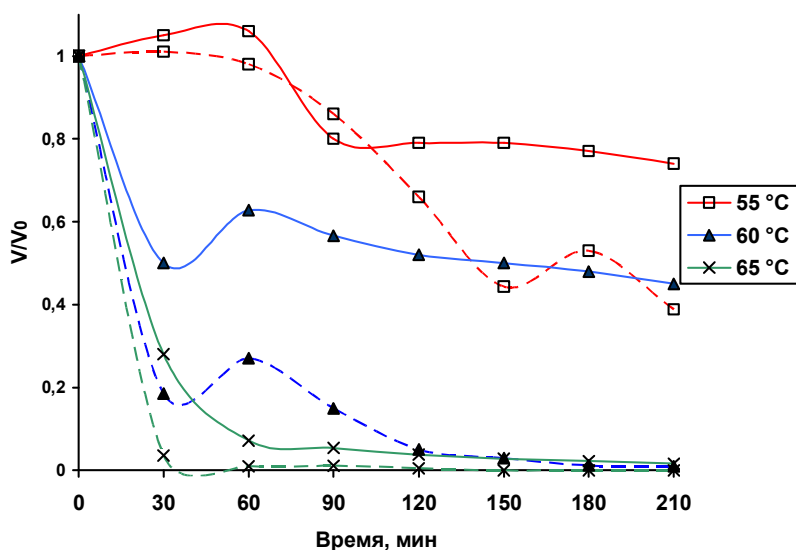


Рис. 1. Кинетические кривые термоинактивации α -галактозидазы *C. cladosporioides* при различных температурах инкубации

— очищенный фермент,
 ---- неочищенный ферментный препарат

Fig. 1. Thermal inactivation kinetic curve of *C. cladosporioides* α -galactosidase at different incubation temperature

— purified enzyme,
 ---- crude enzyme preparation

При температурі 55 і 60 °С на кінетических кривих спостерігаються індукційні ділянки, що може бути пов'язано з утворенням проміжних форм α -галактозидази *C. cladosporioides*, які не супроводжуються втратою активності.

Всі розраховані кінетическі параметри процесу термоінактивації α -галактозидази *C. cladosporioides* представлені в таблиці. Ефективна константа швидкості денатурації при температурі 55 °С була $5,35 \cdot 10^{-5} \text{ c}^{-1}$, при підвищенні температури вона зростала і при 65 °С склала $1,94 \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$.

Таблиця

Кінетическі константи термоінактивації α -галактозидази *C. cladosporioides*

Table

Thermal inactivation kinetic constant of *C. cladosporioides* α -galactosidase

T, °C	$k_p, \text{ c}^{-1}$	$k_{-p}, \text{ c}^{-1}$	$K_{duc}, \text{ мкМ}$	$k_{ден}, \text{ c}^{-1}$
55	$6,5 \cdot 10^{-5}$	$9,3 \cdot 10^{-5}$	0,7	$5,35 \cdot 10^{-5}$
60	$4,45 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^{-4}$	1,67	$9,5 \cdot 10^{-5}$
65	$3,6 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$	29,20	$1,94 \cdot 10^{-4}$

Для розрахунку кількості стадій, не супроводжуваних втратою активності, використовували емпіричну формулу, запропоновану Полтораком і соавт. [2] і отриману шляхом моделювання процесу інактивації на комп'ютері. В умовах нашого експерименту спостерігається мінімум дві стадії процесу термоінактивації, які не супроводжуються втратою активності.

Для визначення енергії активації побудували графік в координатах рівняння Аррениуса $\ln k_{ден} = f(1/T)$ (рис. 2). Тангенс кута нахилу цього графіка дозволив знайти енергію активації переходу окремої суб'єдиниці α -галактозидази з нативного стану в денатуроване рівну 165 кДж/моль.

Необхідно звернути увагу, що при великих відрізках часу в системі будуть проходити тільки необоротні зміни до повної інактивації ферменту. Необоротні зміни в молекулах ферментів виникають практично в момент початку термоінактивації, однак спочатку вони майже не виявляються на фоні оборотних реакцій. Також слід відзначити, що енергія активації цих процесів суттєво вище, ніж у оборотних і вимагає більшого часу для їх завершення. В цей період існують механізми для реінактивації ферменту.

При проведенні досліджень по реінактивації α -галактозидази *C. cladosporioides* було показано, що після 3-х годин термоінактивації при 55 і 60 °С ферментні препарати були здатні відновлювати свою активність на 7–10%. Однак при зберіганні цього ж препарату при 65 °С фермент практично весь переходив в денатуровану форму, неспроможну до реінактивації, впродовж 30 хв. При оцінці впливу ступеня очищення ферменту на його стійкість до дії високих температур було показано, що очищені ферменти мали більшу термостабільність (рис. 1). Ймовірно, в неочищених препаратах спостерігався ефект інгібування ферменту присутніми в культуральній рідині і препаратах грубої очищення продуктами реакції і субстратами.



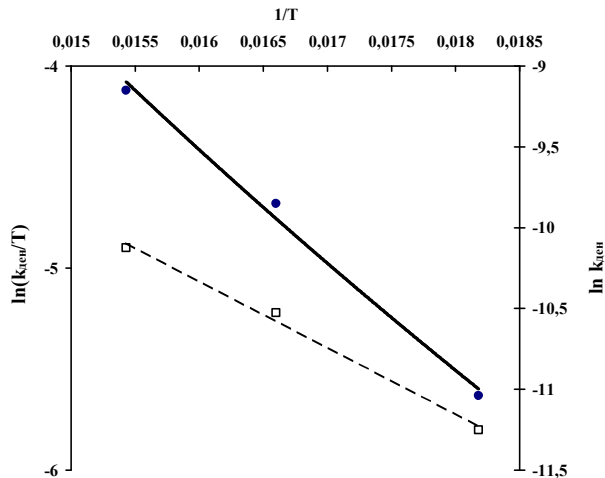


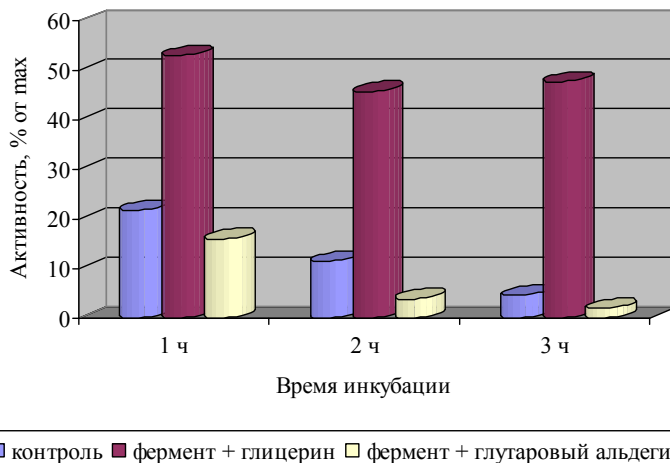
Рис. 2. Зависимость констант скорости денатурации от температуры:

--- $\ln(k_{\text{ден}}/T)$, — $\ln k_{\text{ден}}$.

Fig. 2. Temperature dependence upon denaturation rate constant:

--- $\ln(k_{\text{ден}}/T)$, — $\ln k_{\text{ден}}$.

При изучении возможностей замедления процесса термоинактивации α -галактозидазы *C. cladosporioides* в присутствии некоторых сахаров, субстратов фермента и БСА было показано, что защитный эффект на протяжении первого часа инкубации при 55–60 °С наблюдался в присутствии галактозы (на 15%), мелибиозы, раффинозы и стахиозы (45%, 21% и 15%) и альбумина (на 19%), незначительные протективные свойства были отмечены у трегалозы и мальтозы (около 8%), однако ко второму часу влияние этих веществ полностью нивелировалось. Значительный защитный эффект наблюдался в присутствии глицерина (на 30–40%) на протяжении 3 часов инкубации при 65 °С (рис. 3).

Рис. 3. Зависимость активности α -галактозидазы *C. cladosporioides* от времени в присутствии глицерина и глутарового альдегида при 65 °СFig. 3. *C. cladosporioides* α -galactosidase dependence upon time in presence of glycerol and glutaraldehyde at 65 °С

Таким образом, нами установлено, что термоинактивация α -галактозидазы *C. cladosporioides* происходит по диссоциативному типу, а при температуре 55 и 60 °С имеется индукционный период, и рассчитано, что число стадий, не сопровождающееся потерей активности, соответствует двум. При этих температурах установлены кинетически различимые две стадии процесса термоинактивации: обратимая диссоциация и необратимая денатурация. Рассчитаны кинетические параметры этих процессов. Все эти данные помогут оптимизировать процессы стабилизации молекулы α -галактозидазы на ранних стадиях термоинактивации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маланчук В.М. α -Галактозидаза *P. canescens* 239 і *C. cladosporioides* 189: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. К., 2000. — 21 с.
2. Полторак О.М., Чухрай Е.С., Торшин И.Ю. Диссоциативная термоинактивация, стабильность и активность олигомерных ферментов// Биохимия. — 1998. — 63, № 3. — С. 360—369.
3. McCleary B. α -D-Galactosidase from lucerne and guar seed // Methods Enzymol. — 1988. — 160. — P. 627—632.

Н.В. Борзова, Л.Д. Варбанець

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП ДО 3680, Україна,
тел.: +38 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

ДОСЛІДЖЕННЯ ТЕРМОІНАКТИВАЦІЇ α -ГАЛАКТОЗИДАЗИ *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES*

Реферат

Досліджено термостабільність α -галактозидази *Cladosporium cladosporioides* у діапазоні температур 55–60 °С. Розраховані деякі термодинамічні параметри та запропоновано механізм термоінактивації ферменту. Енергія активації переходу окремої субодиниці α -галактозидази із нативного стану у денатурований склала 165 кДж/моль. Показана стабілізація молекули ферменту у присутності бичачого сироваткового альбуміну (на 19%), гліцерину (на 30–40%), галактози (на 15%), мелібіози, рафінози та стахіози (45%, 21% і 15%).

Ключові слова: α -галактозидаза, *Cladosporium cladosporioides*, термоінактивация.



N.V. Borzova, L.D. Varbanets

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Academ. Zabolotny str., Kyiv, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

**STUDY OF THERMAL INACTIVATION *CLADOSPORIUM*
CLADOSPORIOIDES α -GALACTOSIDASE**

Summary

Thermostability of *Cladosporium cladosporioides* of α -galactosidase was studied in the range of 55 °C and 60 °C. Some of the thermodynamic parameters have been estimated and the mechanism of thermal inactivation has been suggested. Activation energy of transition α -galactosidase subunit from native to denatured state was 165 kJ/M. Stabilization of enzyme molecule in the presence of BSA (19%), glycerol (30–40%), galactose (15%), melibiose, raffinose and stachyose (45%, 21% and 15%) was shown.

Key words: α -galactosidase, *Cladosporium cladosporioides*, thermal inactivation.

