УДК 577.158.54 **doi 10.15407/biotech7.06.023**

ТЕРМОИНАКТИВАЦИЯ α-L-РАМНОЗИДАЗЫ *Eupenicillium erubescens*

Е. В. Гудзенко
Н. В. Борзова
Л. Д. Варбанец

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

E-mail: nv_borzova@bigmir.net

Получено 25.09.2014

Цель работы — изучение особенностей термоинактивации α-L-рамнозидазы *Eupenicillium erubescens* для дальнейшей разработки стратегии повышения стабильности энзима. Исследованы две формы α-L-рамнозидазы, полученные при выращивании продуцента на различных источниках углерода (рамноза и нарингин). Установлено, что при температурах выше 60 °С процесс термоинактивации описывается уравнением первого порядка. Стабильность α-L-рамнозидазы из продуцента, выращенного на нарингине, определяется гидрофобными взаимодействиями, которые преобладают над электростатическими. Показано, что агрегация энзимных молекул может приводить к их термостабилизации. Отмечена важная роль остатков цистеина и, возможно, катиона металла в поддержании активной формы α-L-рамнозидаз *E. erubescens*.

Ключевые слова: *Eupenicillium erubescens*, α-L-рамнозидаза, термоинактивация, нарингин, рамноза.

Изучение путей стабилизации протеиновой молекулы — один из необходимых этапов получения промышленно перспективных энзимов. Такие исследования позволяют установить границы применения энзимов, разработать наиболее эффективные параметры их получения без потери каталитической активности, увеличить период полужизни и степень гидролиза субстрата. Сохранение активной конформации протеина для длительного и эффективного его использования — задача как фундаментальных, так и прикладных исследований современной энзимологии.

Выяснение механизмов термоинактивации энзимов является приоритетным направлением при разработке путей термостабилизации протеинов, используемых в биотехнологических процессах. Одним из соответствующих биокатализаторов является α-L-рамнозидаза, применяемая в производстве соков благодаря способности гидролизовать нарингин и гесперидин цитрусовых, а также биофлавоноиды виноградного сырья. Такая обработка обеспечивает устранение горечи и усиление аромата соков и вин. Эти технологические процессы нуждаются в энзимах, проявляющих высокую стабильность и активность в условиях повышенных температур.

Гликозидазы микроорганизмов представляют обширную группу энзимов, которые находят все более широкое применение в различных биотехнологических процессах. α-L-рамнозидаза (КФ 3.2.1.40) является наиболее перспективным и востребованным энзимом в производстве соков и вин [1]. Этот энзим осуществляет отщепление терминальных невосстановленных остатков L-рамнозы, которые присутствуют как в синтетических, так и в природных гликозидах, олиго- и полисахаридах, гликолипидах и других гликоконъюгатах. Путем гидролиза терпеновых гликозидов — рутинозидов α-L-рамнозидаза способствует высвобождению ароматических соединений, усиливающих аромат виноградных соков и вин. Расщепление биофлавоноида нарингина с помощью α-L-рамнозидазы позволяет избавиться от горечи в цитрусовых соках, что способствует повышению их вкусовых качеств [2, 3].

Ранее нами были изучены физико-химические свойства и компонентный состав α-L-рамнозидазы *Eupenicillium erubescens* [4]. Установлено, что энзим проявляет высокую стабильность в диапазоне рН 4,0–6,0 и температуры 37–60 °С. Оптимум действия энзима наблюдается при рН 5,0 и 60 °С. Результаты исследования компонентного состава показали, что молекула протеина содержит высокий процент гидрофобных аминокислот (34%) и около 1% углеводов, представленных рамнозой, ксилозой, маннозой, галактозой, глюкозой, рибозой и арабинозой.

В литературе есть данные о том, что стабильность энзима может зависеть от многих факторов, в том числе и от состава питательной среды [5]. Сложные источники углеводов в случае гликозидаз позволяют получать при глубинном культивировании продуцента более активные и стабильные энзимы. Поскольку практически отсутствуют данные о механизме термоинактивации α-L-рамнозидаз и способах повышения их активности, целью исследования было изучить особенности термоинактивации двух форм α-L-рамнозидазы *E. erubescens*, установить механизмы этого процесса с целью разработки в дальнейшем эффективной стратегии стабилизации энзима.

Материалы и методы

Культура *E. erubescens* была получена из музея живых культур Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАНУ, штамм-продуцент выделен из почвы в отделе физиологии и систематики микромицетов. В работе были использованы 2 препарата α-L-рамнозидаз, полученные из культуральной жидкости продуцента *E. erubescens*, выращенного на средах с рамнозой (α-L-Rham R) или нарингином (α-L-Rham N) в качестве единственного источника углерода (5 г/л). Препараты энзимов очищали согласно ранее разработанной процедуре [4].

α-L-рамнозидазную активность определяли, как описано ранее с использованием *n*-нитрофенильного субстрата [6]. Протеин определяли методом Лоури [7].

Термоинактивацию α-L-рамнозидаз исследовали при температуре 60 °С, рН 5,2 (0,1 М фосфатно-цитратный буфер — ФЦБ). Кинетику термоинактивации изучали следующим образом. Образцы энзима в соответствующем буфере (3 мл) выдерживали при заданной температуре на протяжении 1,5–3 ч. Через определенные промежутки времени (10–30 мин) отбирали аликвоты по 0,1 мл для измерения остаточной α-L-рамнозидазной активности. Константу скорости инактивации определяли по тангенсу угла наклона прямой на графике зависимости натурального логарифма остаточной энзимной активности от времени.

Определение молекулярной массы методом гель-фильтрации проводили на колонке (1,3×52 см) с Sepharose 6B, уравновешенной 0,1 М фосфатным буфером, рН 6,0. Элюцию протеина контролировали по поглощению раствора при 280 нм и по активности энзима. Молекулярную массу определяли с помощью маркеров: бычий сывороточный альбумин (67 кДа), овальбумин (43,0 кДа), карбоангидраза (30,0 кДа), ингибитор трипсина сои (20,0 кДа).

Для обработки энзима глутаровым альдегидом к 1 мл очищенного раствора энзима (5 Е/мл) добавляли 10–50 мкл 50%-го раствора глутарового альдегида и выдерживали при комнатной температуре в течение 60 мин. Остатки реагента удаляли гель-фильтрацией на Sepharose 6B. Термоинактивацию проводили как описано выше.

Влияние ионной силы на термостабильность α-L-рамнозидаз определяли, используя ФЦБ в концентрации от 0,01 до 1 М, рН 5,2. Влияние NaCl на термостабильность энзимов исследовали в диапазоне концентраций соли 0,025–4,5 М (ФЦБ рН 5,2); зависимость термостабильности препаратов от концентрации энзима — при 0,025–0,3 Е/мг протеина. Влияние концентрации субстрата на активность и термостабильность α-L-рамнозидаз оценивали в стандартных условиях: 0,1 М ФЦБ, рН 5,2 при варьировании концентрации нарингина от 0,25 до 4 мМ.

Реагенты тиолдисульфидного обмена (дитиотреитол, меркаптоэталон, глутатион) и ЭДТА в экспериментах по термоинактивации использовали в концентрации 10^{-3} М.

Все эксперименты проводили не менее чем в 3–5 повторах ($M \pm m$). Статистическую обработку экспериментальных серий осуществляли с помощью программного пакета Microsoft Excel стандартными методами с определением t-критерия Стьюдента при 5%-м уровне значимости [8].

Результаты и обсуждение

Сравнительное изучение термостабильности двух форм α-L-рамнозидаз, α-L-Rham R и α-L-Rham N, полученных при выращивании на различных источниках углеводов — нарингине и рамнозе, соответственно, показало, что процесс термоинактивации обоих препаратов энзимов следует кинетике первого порядка (рис. 1), что характерно для низкомолекулярных энзимов [9], к которым относится и α-L-рамнозидаза *E. erubescens* (молекулярная масса 40 кДа [4]). Потеря стабильности в этом случае может объясняться разворачиванием полипептидной цепи

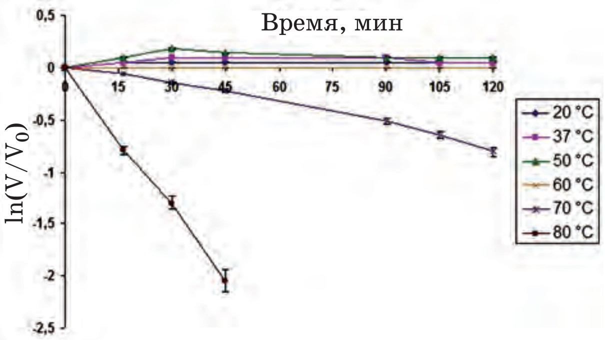

Рис. 1. **Кинетика термоинактивации α-L-Rham N *E. erubescens* при различных температурах (рН 5,2; *n* = 5)**

вследствие ослабления внутримолекулярных связей.

Для определения вклада электростатических и гидрофобных взаимодействий в стабильность грибных α-L-рамнозидаз были проведены исследования процессов термоинактивации в растворах с различной ионной силой и при различных концентрациях хлорида натрия. В первом случае варьировали концентрацию ФЦБ от 0,01 до 1 М (рН 5,2), во втором — NaCl от 0,025 до 4,5 М (рН 5,2). Показано, что с увеличением ионной силы раствора происходит постепенное снижение стабильности обеих рамнозидаз (α-L-Rham R и α-L-Rham N), однако динамика этого процесса отличается (рис. 2). Повышение диэлектрической проницаемости среды приводит вначале к ослаблению электростатических взаимодействий, а затем, при увеличении концентрации соли, стабильность вновь начинает возрастать, поскольку усиливаются гидрофобные взаимодействия. Анализ кривых зависимости константы инактивации от концентрации буфера позволяет сделать вывод о том, что в случае α-L-Rham R вклад гидрофобных и электростатических взаимодействий в стабильность энзима примерно одинаков. Для α-L-Rham N отмечается бóльшая роль гидрофобных взаимодействий.

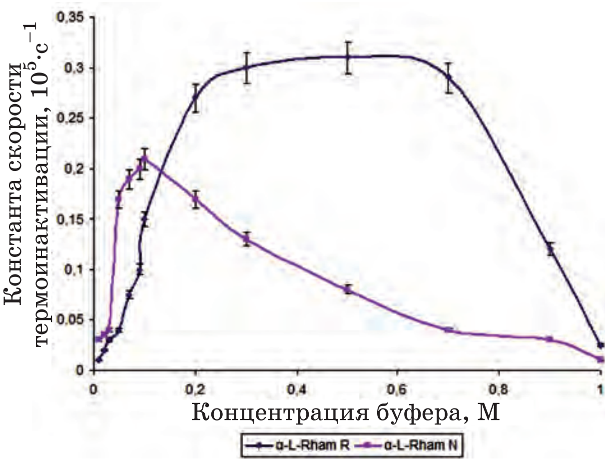

Рис. 2. **Зависимость константы скорости термоинактивации α-L-рамнозидаз *E. erubescens* от концентрации ФЦБ**
Здесь и на рис. 3–8: рН 5,2; температура 60 °С; *n* = 5–7

Изучение термоинактивации энзимов при возрастающих концентрациях NaCl продемонстрировало ее увеличение α-L-Rham R и α-L-Rham N (рис. 3). Этот эффект может быть связан с меньшими размерами хлорид-иона по сравнению с фосфат-ионом, что позволяет первому при высоких концентрациях проникать вглубь протеиновой глобулы и вызывать тем самым дестабилизацию энзима.

Для практического использования рамнозидаз и достижения большего количества циклов необходимо использовать высокие концентрации субстратов. Нами были проведены исследования термоинактивации α-L-Rham R и α-L-Rham N при различных концентрациях нарингина. В этих экспериментах также наблюдалась первоначальная дестабилизация энзимов, затем незначительная стабилизация и при концентрации более 3 М — стремительное падение стабильности (рис. 4). Эти данные также подтверждают важную роль гидрофобных взаимодействий в стабильности α-L-Rham R и α-L-Rham N, причем для α-L-Rham N она значительно сильнее. С другой стороны, показано, что в диапазоне концентраций нарингина от 1 до 2,5 М, которые используются на практике [3], не происходит дестабилизации энзимов. Применение в качестве стабилизирующего агента продукта реакции — рамнозы — не оказывало защитного эффекта.

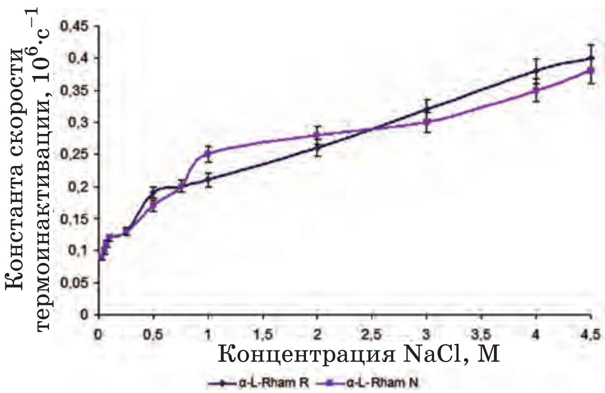

Рис. 3. **Зависимость константы скорости термоинактивации α-L-рамнозидаз *E. erubescens* от концентрации NaCl**

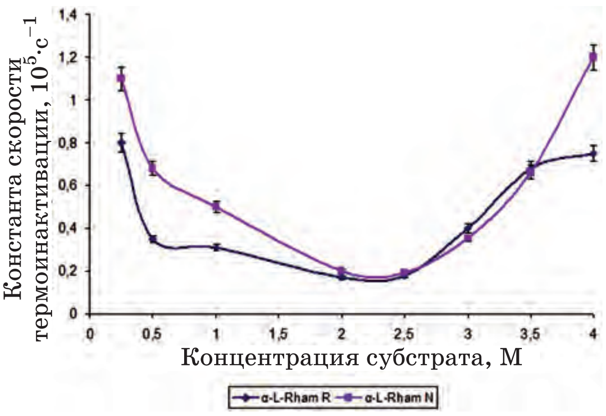

Рис. 4. **Зависимость константы скорости термоинактивации α-L-рамнозидаз *E. erubescens* от концентрации субстрата**

Известно [10, 11], что инактивация энзимов, особенно низкомолекулярных, может происходить также за счет агрегации молекул протеинов. Протеин-протеиновые взаимодействия можно подавить путем разбавления растворов энзимов. Однако нами было установлено, что термостабильность α-L-Rham R и α-L-Rham N при разведении снижалась (рис. 5). Результаты хроматографии на Sepharose 6B нативных и инактивированных препаратов α-L-Rham R и α-L-Rham N также показали отсутствие агрегации за счет ковалентных взаимодействий, что свидетельствует об ином механизме денатурации этих энзимов. Можно также предположить, что агрегация в данном случае оказывает стабилизирующий эффект, поскольку в присутствии глутарового альдегида скорость термоинактивации α-L-Rham R и α-L-Rham N снижалась (рис. 6). Вероятно, образованные альдегидом сшивки повышают жесткость активного центра, стабилизируя энзимы.

Высокотемпературная инактивация позволяет судить о механизмах денатурации и разрабатывать стратегию увеличения полужизни энзимов. Поскольку ранее [4] нами было показано, что в молекуле энзима присутствуют остатки цистеина, были проведены исследования влияния реагентов тиолдисульфидного обмена при 20 и 60 °C. Установлено, что глутатион, дитиотреитол и меркаптоэтанол в концентрации 10^{-3} М снижают период полужизни α-L-Rham R и α-L-Rham N в несколько раз, хотя наблюдаются некоторые отличия в скорости инактивации энзимов в зависимости от способа их получения (рис. 7). Таким образом, можно сделать вывод о важном вкладе окисления цистеина в стабильность α-L-Rham R и α-L-Rham N.

Важно также отметить влияние ЭДТА на термостабильность исследуемых α-L-рамнозидаз. Присутствие ЭДТА оказывает значительное влияние на активность и термостабильность энзимов при 20 и 60 °C (рис. 8). Это подтверждает полученные нами ранее данные о том, что α-L-рамнозидаза *E. erubescens* — металлозависимый энзим [4].

Таким образом, в результате проведенных исследований были отмечены некоторые различия в активности и стабильности

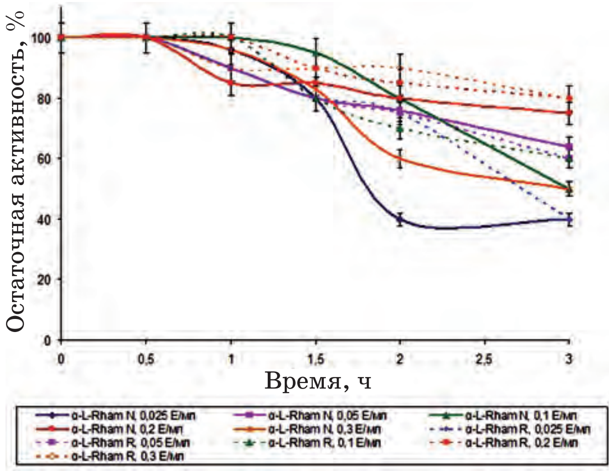

Рис. 5. **Зависимость активности α-L-рамнозидаз *E. erubescens* от времени при различных концентрациях энзима**

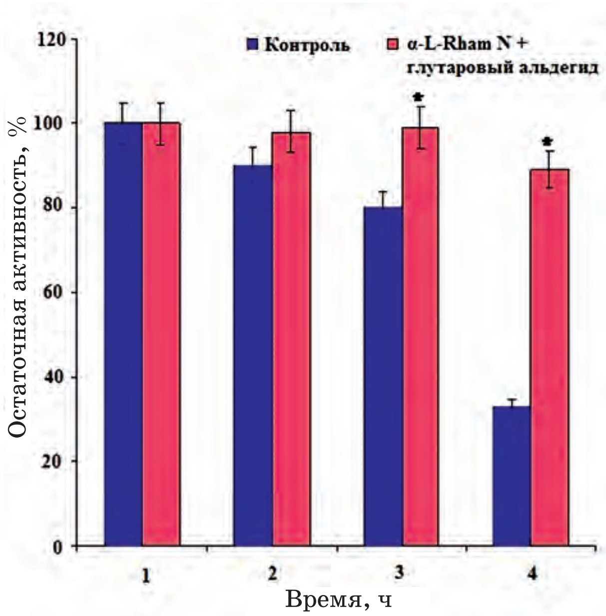

Рис. 6. **Термостабильность α-L-рамнозидазы *E. erubescens* в присутствии глутарового альдегида:**
* — $P < 0,05$

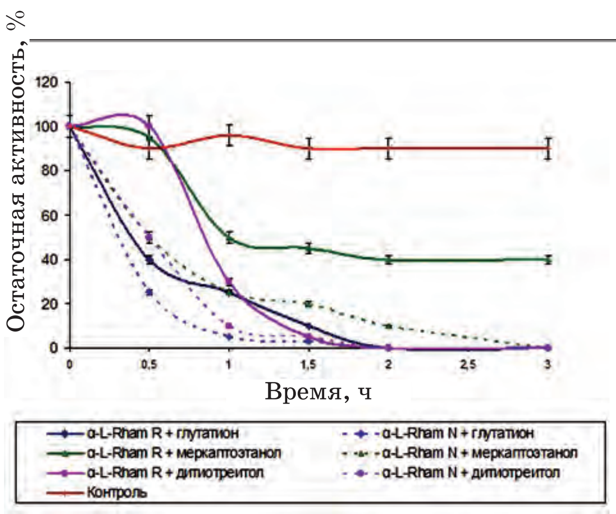

Рис. 7. **Зависимость активности α-L-рамнозидаз *E. erubescens* в присутствии реагентов тиолдисульфидного обмена (10^{-3} М)**

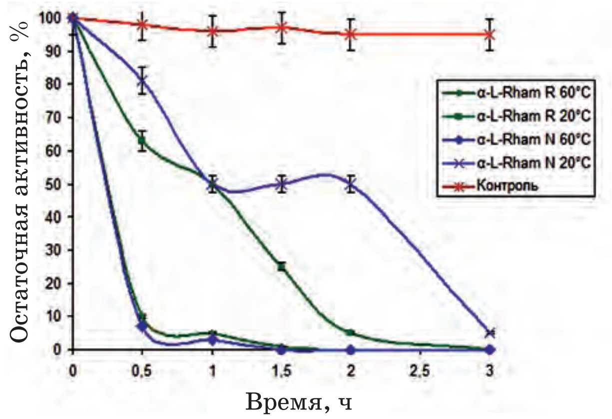

Рис. 8. **Зависимость активности α-L-рамнозидаз *E. erubescens* в присутствии 10^{-3} М ЭДТА при различных температурах**

α-L-рамнозидаз *E. erubescens*, полученных при различных условиях инкубации. Установлено, что стабильность α-L-Rham N в основном определяют гидрофобные взаимодействия, в то время как для α-L-Rham R вклад электростатических и гидрофобных составляющих примерно равен. Показано, что агрегация молекул энзимов приводит к термостабилизации как α-L-Rham R, так и α-L-Rham N. Следует отметить важную роль цистеина в поддержании активной конформации рамнозидаз *E. erubescens*. В экспериментах с использованием ЭДТА наблюдалось значительное снижение активности и стабильности энзимов, что свидетельствует о необходимости присутствия в данном случае катиона металла.

REFERENCES

1. *Yadav V., Yadav P. K., Yadav S., Yadav K. D. S.* α-L-Rhamnosidase: A review. *Proc. Biochem.* 2010, 45 (8), 1226–1235.
2. *Yadav S., Yadav V., Yadav S., Yadav K. D. S.* Purification, characterisation and application of α-L-rhamnosidase from *Penicillium citrinum* MTCC-8897. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2012, 47 (2), 290–298.
3. *Puri M.* Updates on naringinase: structural and biotechnological aspects. *Appl. Microb. Biotechnol.* 2012, 93 (1), 49–60.
4. *Varbanets L. D., Gudzenko O. V., Borzova N. V.* Rhamnosidase from *Eupenicillium erubescens*: purification and characterization. *Nauka i studia.* 2013, 41 (109), 11–23.
5. *Soria F., Ellenrieder G.* Thermal inactivation and product inhibition of *Aspergillus terreus* CECT 2663 α-L-rhamnosidase and their role on hydrolysis of naringin solutions *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002, 66 (7), 1442–1449.
6. *Davis D. W.* Determination of flavonones in citrus juice. *Anal. Biochem.* 1947, 19 (1), 46–48.
7. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193 (2), 265–275.
8. *Lakin G. F.* Biometrics. *Moskow: Vysshaia shkola*. 1990, 325 p. (In Russian).
9. *Santos A., Ladero M., Garcia-Ochoa F.* Kinetic modeling of lactose hydrolysis by β-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enz. Microb. Technol.* 1998, 22 (8), 558–567.
10. *Poltorak O. M., Chukhray E. S., Torshin I. Yu.* Dissociative thermoinactivation, stability and activity of olygomeric enzymes. *Biokhimiia*. 1998, 63(3), 360–369. (In Russian).
11. *Kurganov B. I.* Kinetics of heat aggregation of proteins. *Biokhimiia*. 1998, 63 (3), 430–432. (In Russian).

ТЕРМОІНАКТИВАЦІЯ α-L-РАМНОЗИДАЗИ *Eupenicillium erubescens*

О. В. Гудзенко
Н. В. Борзова
Л. Д. Варбанець

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

E-mail: nv_borzova@bigmir.net

Мета роботи — вивчення особливостей термоінактивації α-L-рамнозидази *Eupenicillium erubescens* для подальшої розробки стратегії підвищення стабільності ензиму. Досліджено дві форми α-L-рамнозидази, одержані під час вирощування продуцента на різних джерелах вуглецю (рамноза та нарингін). Встановлено, що за температур вищих за 60 °С процес термоінактивації описується рівнянням першого порядку. З'ясовано, що стабільність α-L-рамнозидази з продуцента, вирощеного на нарингіні, визначається гідрофобними взаємодіями, які переважають над електростатичними. Показано, що агрегація ензимних молекул може зумовлювати їх термостабілізацію. Відзначено важливу роль залишків цистеїну та, можливо, катіону металу для підтримання активної форми α-L-рамнозидаз *E. erubescens*.

Ключові слова: *Eupenicillium erubescens*, α-L-рамнозидаза, термоінактивація, нарингін, рамноза.

THE THERMAL INACTIVATION OF *Eupenicillium erubescens* α-L-RHAMNOSIDASE

O. V. Gudzenko
N. V. Borzova
L. D. Varbanets

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

E-mail: nv_borzova@bigmir.net

The study of the features of thermal inactivation of α-L-rhamnosidase from *Eupenicillium erubescens* aiming to develop further strategies for improving the stability of the enzyme was the purpose of the research. Two forms of α-L-rhamnosidase were studied. They were obtained by producer cultivation on two different carbon sources (rhamnose and naringin). It was shown that at temperatures above 60 °C heat inactivation process is described by the first order reaction kinetics. It was established that stability of α-L-rhamnosidase from *E. erubescen*, grown on naringin depends on hydrophobic interactions rather than electrostatic ones. It was shown that aggregation of enzyme molecules could lead to their thermal stabilization. The important role of cysteine residues and possible involvement of the metal cation in maintaining of active form of α-L-rhamnosidases from *E. erubescens* was highlighted.

Key words: *Eupenicillium erubescens*, α-L-rhamnosidase, thermal inactivation, naringin, rhamnose.