



УДК 577.153.2

РОЛЬ КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП В КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗЫ I *RHIZOPUS ORYZAE* 1403

**С.А. Шеламова¹,
Ю.А. Тырсин²**

¹ Воронежский филиал Российского экономического университета им. Г. В. Плеханова, Россия, 394036, г. Воронеж, ул. К. Маркса, 67А

² Московский государственный университет пищевых производств, Россия, 125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11

E-mail: shelam@mail.ru

Участие карбоксильных групп в каталитическом действии липазы I *Rhizopus oryzae* 1403 доказано инактивацией карбодиидом (EDC) в присутствии нуклеофила – этилового эфира глицина. Аминокислотный анализ модифицированного фермента исключил возможность реагирования с EDC тирозина и гистидина, а отсутствие восстановления активности гидроксиламином – с серином. При практически полной потере активности фермента модифицировалось 11 карбоксильных групп; при условии псевдопервого порядка реакции гидролиза – 4. Кинетические исследования гидролиза триолеина и трибутирина после модификации липазы показали, что V_{max} мало отличались на обоих субстратах, а значения K_m на трибутирине увеличилось в 1.47, а на триолеине – в 1.18 раз. Это говорит об участии карбоксильных групп в создании активной конформации фермента при связывании с определенным субстратом.

Ключевые слова: липаза, *Rhizopus*, карбоксильные группы.

Введение

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 использовались методы химической модификации [1, 2], сайт-направленного мутагенеза [3, 4], молекулярного моделирования [5, 6]. Установлено, что большинство липолитических ферментов действуют как сериновые гидролазы с триадой Ser-Gis-Asp в активном центре [7–12]. Однако липаза *Burkholderia sp.* является тиоловым ферментом, имеющим в активном центре цистеин [13]. Наряду с этим обнаружена липаза из *Mucor hiemalis f. hiemalis*, каталитическая активность которой остается неизменной при воздействии как модификаторов серина, так и цистеина [14]. Механизм её действия изучается.

Важность карбоновой кислоты в каталитической триаде дебатировалась много лет. Изначально получила почти всеобщее признание гипотеза переноса заряда, согласно которой ϵ -азот имидазола играет роль общего основания, чтобы облегчить атаку серина на субстрат, а роль Asp-CO₂⁻ состоит в удалении протона от δ -азота иона имидазола. Впоследствии на основании термодинамических расчетов и компьютерного моделирования стало ясно, что полный перенос заряда неблагоприятен. Были сделаны предположения, что первичная роль карбоксильной группы – скорее в стабилизации требуемой конформации имидазола гистидина, а не общесосновного катализатора. В своих работах Warshel et al. [15, 16] показали, что энергия реорганизации ориентирования полярных групп в активном центре фермента является небольшой относительно реакции в растворе, потому что диполи уже размещены надлежащим образом для взаимодействия с переходным состоянием. Они нашли удовлетворительное объяснение эффективности сериновых эстераз в этой предорганизации.

Липолитический комплекс *Rhizopus oryzae* 1403 представляет большой практический интерес в области создания структурных триацилглицеролов с функциональными свойствами в связи с широкой субстратной и 1,3-позиционной специфичностью. При исследовании каталитических свойств одной изоформы липазы этого продуцента – Липазы I подтверждено наличие в ее активном центре гистидина и серина. Представляло интерес изучение значения карбоксильных групп в реакции гидролиза эфирной связи этим ферментом.

Объекты и методы исследования

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 микроорга-

низмов; оливковое масло – Aceites Borges Pont (Испания); 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)карбодиимидгидрохлорид (EDC) и этиловый эфир глицина – Sigma Chemical Co (США); другие реагенты российского производства марки х.ч.

Гидролитическую активность липазы определяли модифицированным методом К. Yamada и Н. Machida [17]. Субстрат – оливковое масло. За единицу активности липазы принимали такое количество фермента, которое освобождает 1 μ моль жирной кислоты за 1 мин.

Для модификации фермент в количестве 10 μ М растворяли в 50 мМ растворе этилового эфира глицина. Значения рН устанавливали буферными растворами по Макилвэйну. Затем добавляли EDC в количестве 50 мМ. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты реакционной смеси, разбавляли их 5-кратным количеством 1 М ацетата натрия и определяли остаточную активность и скорость гидролиза.

Для определения аминокислотного состава модифицированного фермента его осаждали 10%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ) из реакционной смеси. Все примеси были удалены 5-кратным промыванием 5%-ным раствором ТХУ и абсолютным этанолом. Осадки высушивались в вакууме и подвергались аминокислотному анализу на автоматическом аминокислотном анализаторе ААА-339Т МИКРОТЕХНА (Чехия).

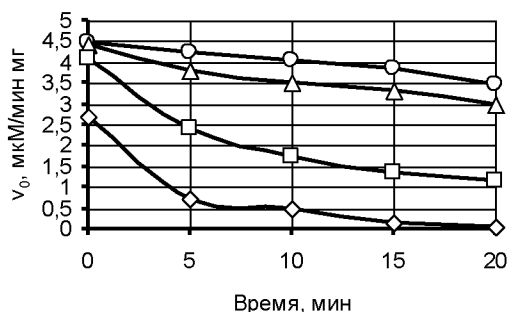
Для определения кинетических характеристик гидролиза регистрировали накопление свободных жирных кислот (СЖК) методом рН-статирования [18]; в качестве субстрата использован трибутирин. Начальную скорость рассчитывали по тангенсу угла наклона кинетических кривых [19]. Исследования проводились в диапазоне концентраций фермента от 10 до 150 мкг/см³, дающем прямолинейную зависимость от значений начальных скоростей.

Результаты и их обсуждение

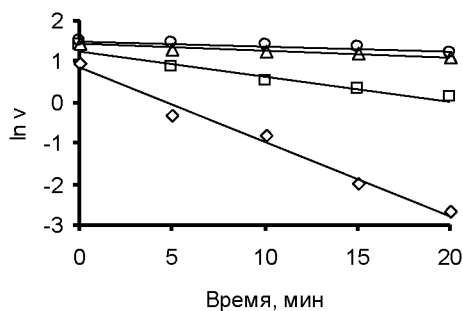
Для исследования роли карбоксильных групп в действии Липазы I был использован метод, который предполагает реагирование белка с карбодиимидом, происходящее при конденсации с нуклеофилом.

В качестве ингибитора был взят EDC, а нуклеофила – этиловый эфир глицина. Установлено, что уменьшение скорости гидролиза трибутирина сильно зависело от концентрации водородных ионов. Соответствующие преобразования позволили определить рК группы (рис. 1), участвующей в катализе – 5,0, что согласуется со значением, полученным из зависимости (v , рН).

Известно, что карбодиимиды способны реагировать с другими аминокислотными остатками. Аминогруппу лизина можно исключить из-за ее высокого рК, который будет препятствовать реакции в условиях данного эксперимента. С тирозином и гистидином карбодиимиды образуют устойчивые к кислотному гидролизу соединения.



А



Б

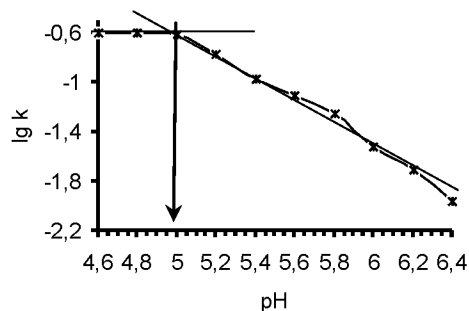


Рис. 1. А – Зависимость скорости гидролиза трибутирина Липазой I, модифицированной EDC при различных значениях рН: (○) 6.4; (△) 6.0; (□) 5.4; (◇) 4.6; Б – Определение рК модифицированной группы

Но аминокислотный анализ модифицированного фермента показал, что количество этих остатков не изменяется (табл. 1).

Таблица 1
Количество остатков гистидина, тирозина и цистеина в Липазе I при модификации EDC (pH 5.0)

| Потеря активности, % | His | Tyr | Cys |
|----------------------|-----|-----|-----|
| 0 | 2 | 3 | 1 |
| 51.2±2.1 | 2 | 3 | 1 |
| 74.1±4.2 | 2 | 3 | 1 |
| 91.6±3.5 | 2 | 3 | 1 |

Если карбодиимиды реагируют с серином, как в случае с химотрипсином, то активность полностью восстанавливается гидроксиламином. Добавление к инактивированной Липазе I NH_2OH не дало такого эффекта (рис. 2). Таким образом, полученные результаты позволяют утверждать, что за инактивацию Липазы I EDC отвечают именно карбоксильные группы. Однако карбодиимиды могут вызывать образование внутримолекулярных связей, что также вызывает потерю активности ферментов. По этому вопросу в литературе имеются противоречивые сведения.

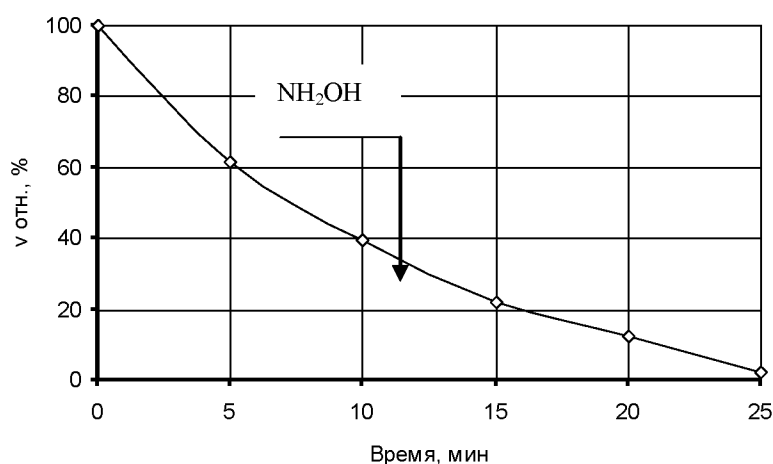


Рис. 2. Влияние гидроксиламина на ход инактивации Липазы I EDC (pH 5.4)

Так, модификация кутиназы EDC не зависела от присутствия нуклеофила [20]. Панкреатическая липаза человека, напротив, не ингибировалась без сложного эфира. Но при этом повреждалась структура фермента, так как скорость денатурации в 8 М мочеvine после модификации возрастала в 14 раз. Кроме того, активный центр титровался диэтил-*n*-нитрофенилфосфатом, не экранировался субстратом, в связи с чем было поставлено под сомнение участие карбоксильной группы в системе с переносом заряда.

Проведенные нами исследования показали, что инактивации Липазы I без нуклеофила не наблюдалось, а предварительная инкубация с субстратом в значительной степени снижала ингибирование (рис. 3).

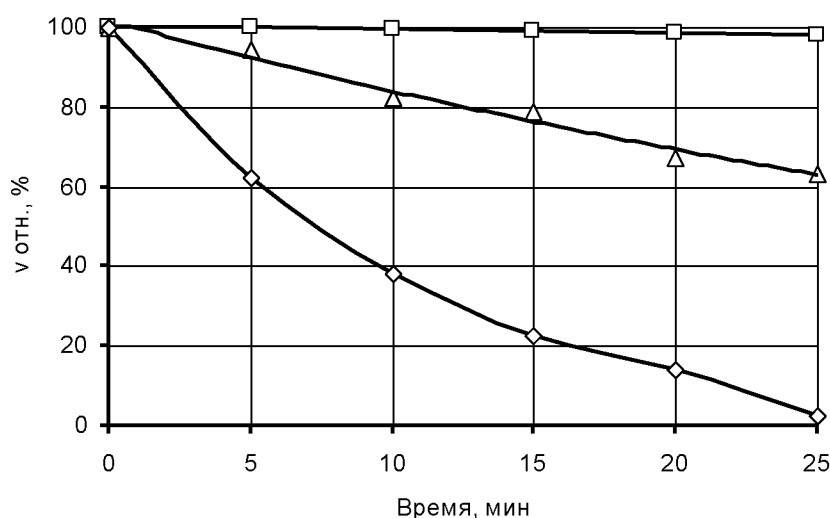


Рис. 3. Ингибирование Липазы I EDC: (□) без эфира глицина; (Δ) с прединкубацией с субстратом; (◇) с эфиром глицина (pH 5.4)

Стехиометрия модификации карбодиимидами вызывает затруднения, так как карбоксильные группы реагируют с ингибитором, как выяснилось, с различной скоростью. Мето-

дами химической модификации у кутиназы доказано наличие одной карбоксильной группы в активном центре [20]. Анализ кинетических констант инактивации панкреатической карбоксилэстеразы показал, что существует одна карбоксильная группа, участвующая в акте катализа и одна вспомогательная группа, необходимая для стабилизации фермента на поверхности раздела [21].

Данные изменения активности Липазы I и количества модифицированных карбоксильных групп, полученного по включению глицина, показаны на рис. 4. При практически полной потере активности в данном ферменте модифицировалось 11 карбоксильных групп. При условии псевдопервого порядка реакции получаем, что для проявления активности необходимо не менее трех групп (рис. 5). По всей вероятности, карбоксильные группы необходимы для поддержания активной структуры. С помощью моделирования молекулярной динамики кутиназы показано, что водородная связь между Asp и His активного центра необходима для ее каталитического действия [22]. По данным, полученным в последние годы для липаз семейства *Rhizomucor miehei*, электростатические взаимодействия не только вблизи активного центра, но и удаленные от него значительно влияют на активность [23].

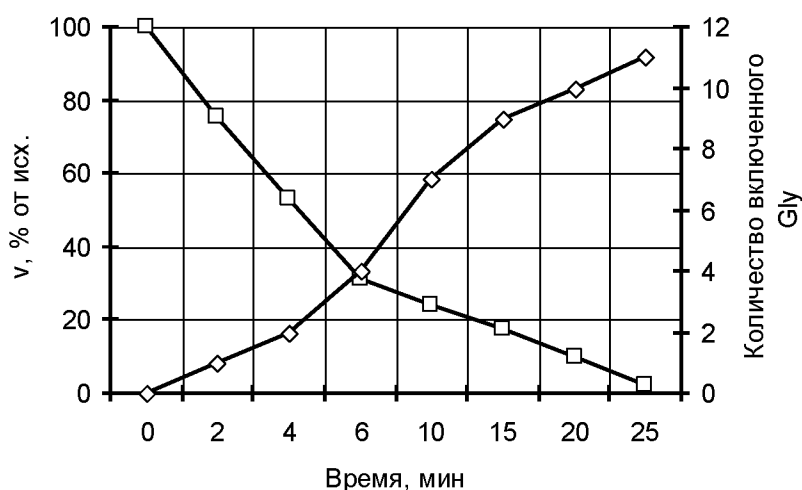


Рис. 4. Определение количества модифицированных карбоксильных групп при инактивации Липазы I карбодиимидом (pH 5.0)

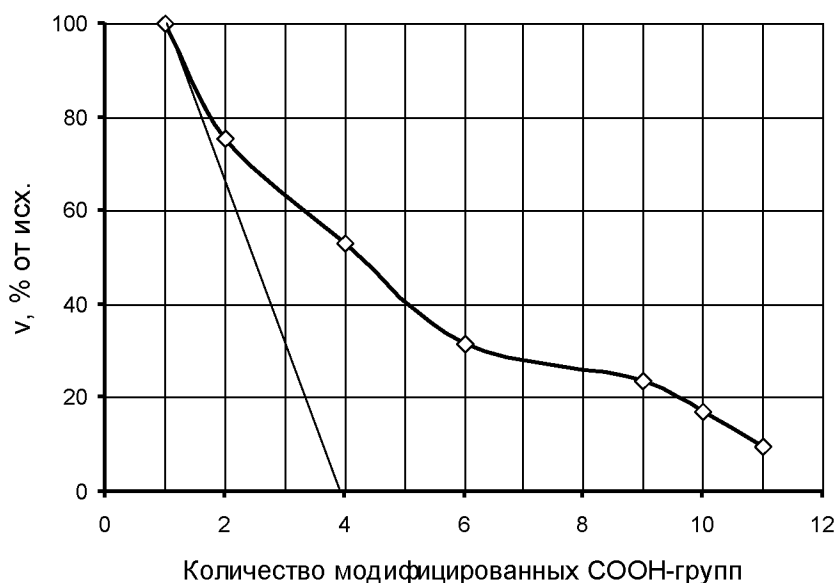


Рис. 5. Стехиометрия ингибирования Липазы I карбодиимидом (pH 5.0)

Для выяснения механизма действия EDC на липазу были определены кинетические параметры гидролиза трибутирина и триолеина (табл. 2).



Таблица 2

**Кинетические параметры гидролиза некоторых субстратов
нативной и модифицированной Липазой I (рН 5.0)**

| Фермент | V_{max} , $\mu\text{моль}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{мг}^{-1}$ | K_M , $\mu\text{моль}$ | (V_{max} / K_M) , $\text{мин}^{-1}\cdot\text{мг}^{-1}$ |
|-------------------|---|--------------------------|---|
| Трибутирин | | | |
| Нативный | 35.6±1.4 | 786±31 | 45.3×10 ⁻³ |
| Модифицированный | 18.6±0.9 | 1154±58 | 16.1×10 ⁻³ |
| Триолеин | | | |
| Нативный | 167.3±6.7 | 352±14 | 0.475 |
| Модифицированный | 92.9±2.8 | 417±20 | 0.223 |

У модифицированного фермента изменились оба параметра. При этом изменение значений V_{max} мало отличались на обоих субстратах, что свидетельствует об участии одного и того же активного центра в катализе. K_M на трибутирине увеличилось в 1.47, а на триолеине – в 1.18 раз. Соответственно в большей степени на трибутирине уменьшилась каталитическая эффективность – в 2.8 раз против 2.15 на триолеине. Это приводит к выводу, что карбоксильные группы отвечают за создание активной конформации фермента при связывании с определенным субстратом. Это согласуется с данными мутагенеза липазы *Staphilococcus hyicus* и липазы/ацилтрансферазы *Aeromonas hydrophila*, в которых замена активного Asp на Glu привела к различной потере активности в зависимости от природы субстрата [24, 25]. Исследование инактивации панкреатической липазы карбодиидами привело к предположению, что карбоксильные группы выполняют структурную роль – при адсорбции на гидрофобной поверхности раздела ими стабилизируется активная конформация фермента. Существует и противоположное сообщение о том, что Asp не участвует в родстве липазы с субстратом [26].

Заключение

Таким образом, проведенный комплекс исследований показал, что, несомненно, EDC в присутствии сложного эфира модифицирует карбоксильные группы в Липазе I и не вызывает образования внутримолекулярных связей. Судя по кинетическим параметрам, карбоксильные группы отвечают как за формирование фермент-субстратного комплекса, так и за его распад. На разных субстратах значения V_{max} изменились в одинаковой степени, что свидетельствует об участии одного и того же активного центра в катализе. Различия в K_M на трибутирине и на триолеине показывают, что карбоксильные группы отвечают за создание активной конформации фермента при связывании с определенным субстратом.

Список литературы

1. Köller W., Kolattukudy P. E. Mechanism of action of cutinase: chemical modification of the catalytic triad characteristic for serine hydrolases // *Biochemistry*. – 1982. – Vol. 21. – Pp. 3083–3090.
2. Lombardo D. Catalytic properties of modified human pancreatic carboxylic-ester hydrolase // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1982. – Vol. 700. – Pp. 75–80.
3. Jäger S., Demleithner G., Götz F. Lipase of *Staphilococcus hyicus*: analysis of the catalytic triad by site-directed mutagenesis // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1992. – Vol. 100. – Pp. 249–254.
4. Hyun-Jun Kwon, Amada Kei, Haruki Mitsuru et al. Identification of the histidine and aspartic acid residues essential for enzymatic activity of a family 1,3 lipase by site-directed mutagenesis // *FEBS Lett.* – 2000. – Vol. 483. – №2–3. – Pp. 139–142.
5. Kazlauskas R. J. Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties // *Trends Biotechnol.* – 1994. – Vol. 12. – Pp. 464–472.
6. *Streptomyces rimosus* GDS (L) lipase: Production, heterologous overexpression and structure-stability relationship / D. Vujaklija, M. Abramic, I. Lescic et al. // *Food Technol. Biotechnol.* – 2003. – Vol. 41. – №1. – Pp. 89–93.
7. Derewenda Z.S., Derewenda U., Dodson G.G. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1,9-Å resolution // *J. Mol. Biol.* – 1992. – Vol. 227. – Pp. 818–839.
8. Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi / U. Derewenda, L. Swenson, R. Green et al. // *Protein Engineering*. – 1994. – Vol. 7. – №4. – Pp. 551–557.
9. 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. – Vol. 39. – №11. – Pp. 2921–2930.
10. Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus* / R.P. Yadav, K.S. Rajendra, R. Gupta, W.S. Davidson // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 1998. – Vol. 28. – №3. – Pp. 243–249.
11. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: A minimal α/β -hydrolase fold enzyme / G. van Pouderooyen, T. Eggert, K.-E. Jaeger, B.W. Dijkstra // *J. Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 309. – №1. – Pp. 215–226.



12. Colin D. Y., Deprez-Beauclair P., Allouche M. et al. Exploring the active site cavity of human pancreatic lipase // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2008. – V. 370. – № 3. – P. 394–398.
13. Yeo S.-H., Takuya N., Yasuhiro Y. Purification and characterization of tert-butyl ester-hydrolyzing lipase from *Burkholderia sp.* YY 62 // *Biosci., Biotechnol. Biochem.* – 1998. – Vol. 62. – №12. – Pp. 2312–2317.
14. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis* / A. Hiol, M.D. Jonzo, D. Druet, L. Comeau // *Enzyme Microb. Technol.* – 1999. – Vol. 25. – №1–2. – Pp. 80–87.
15. Warshel A., Florian J. Computer simulations of enzyme catalysis: finding out what has been optimized by nature // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95. – Pp. 5950–5955.
16. Warshel A. Electrostatic origin of the catalytic power of enzymes and the role of preorganized active sites // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – Pp. 27035–27038.
17. Purification, characterization and crystallization of two types of lipase from *Rhizopus niveus* / M. Kohno, W. Kugimiya, Y. Hashimoto, Y. Morita // *Bioici. Siatech. Blochem.* – 1994. – №6, Vol. 58. – Pp. 1007–1012.
18. Петрова Л.Л., Казанина Г.А., Селезнева А.А. Применение рН-статного метода для изучения ферментативного действия липазы *Penicillium sp.* // *Прикл. биохим. и микроб.* – 1977. – Т. 13. – №5. – С. 758.
19. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: Практический курс. – М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. – 720 с.
20. Köller W., Kolattukudy P. E. Mechanism of action of cutinase: chemical modification of the catalytic triad characteristic for serine hydrolases // *Biochemistry.* – 1982. – Vol. 21. – Pp. 3083–3090.
21. Lombardo D. Catalytic properties of modified human pancreatic carboxylic-ester hydrolase // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1982. – Vol. 700. – Pp. 75–80.
22. Lau E.Y., Bruice T.C. Consequences of breaking the Asp-His hydrogen bond of the catalytic triad: effects on the structure and dynamics of the serine esterase cutinase // *Biophysical Journal.* – 1999. – Vol. 77. – Pp. 85–98.
23. 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. – Vol. 39. – №11. – Pp. 2921–2930.
24. Chang R.-C., Chen J.C., Shaw J.-F. Studying the active site pocket of *Staphylococcus hyicus* lipase by site-directed mutagenesis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – Vol. 229. – №1. – Pp. 6–10.
25. Brumlik M.J., Buckley J.T. Identification of the catalytic triad of the lipase/acyl-transferase from *Aeromonas hydrophila* // *J. Bacteriology.* – 1996. – №7, Vol. 178. – Pp. 2060–2064.
26. Jäger S., Demleither G., Götz F. Lipase of *Staphylococcus hyicus*: analysis of the catalytic triad by site-directed mutagenesis // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1992. – Vol. 100. – Pp. 249–254.

THE ROLE OF CARBOXYL GROUPS IN THE CATALYTIC ACTIVITY OF LIPASE I *RHIZOPUS ORYZAE*1403

S. A. Shelamova¹,
Y. A. Tyrsin²

¹ Voronezh branch of Russian University of Economics named after G. V. Plekhanov, 67A K. Marx St, Voronezh, 394036, Russia

² Moscow State University of Food Production, 11 Volokolamskoe shosse, Moscow, 125080, Russia

E-mail: shelam@mail.ru

Carboxyl group interposition in catalytic action of Lipase I *Rhizopus oryzae* 1403 is proved with the help of inactivated carbodiimide (EDC) over a nucleophile – glycine ethyl ester. The amino acid analysis of modified enzyme has discounted the possibility of tyrosine and histidine reaction with EDC, and absence of activity restoration with hydroxylamine – that of serine. 11 carboxyl groups have been modified in practically complete loss of enzyme activity; 4 – under condition of the pseudo-first order of hydrolysis reaction. Kinetic research of triolein and tributirin hydrolysis have shown that V_{max} on both substrates differed a little, and K_M on tributirin has increased in 1.47, and on triolein - in 1.18 times. It is the evidence of carboxyl group interaction in the creation of enzyme active conformation related to certain substrate.

Key words: lipase, *Rhizopus*, carboxyl groups.