

УДК 577.152.3.

## ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА АЛКОГОЛЬОКСИДАЗЫ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ

И.П. Черникевич, О.Н. Юзефович

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

*Показано, что гистидиновые и тирозиновые б-аминокислотные остатки алкогольоксидазы (КФ 1.1.3.13) не принимают непосредственного участия в каталитическом окислении низших алифатических спиртов. В стабилизации фермента задействован остаток цистеина, связывающий через сульфгидрильную группу апоформу белка с коферментом флавинадениндинуклеотидом.*

**Ключевые слова:** алкогольоксидаза дрожжей, аминокислотные остатки активного центра, модификация.

*It was shown that histidine and tyrosine b-aminoacid alcoholoxidase (EC 1.1.3.13) remains do not participate directly in catalytic oxidation of lower aliphatic alcohol. Within the process of enzyme stabilization cysteine remains are involved, which bind apoform protein molecule with coenzyme flavinadenindinucleotide through sulfhydryl group.*

**Key words:** yeast alcoholoxidase, active center aminoacid remains, modification.

Ферментная технология – новая отрасль науки, изучающая способы получения ферментных препаратов и их применение в промышленности для дальнейшей интенсификации и совершенствования технологических процессов. За последние 10 лет выполнены сотни разработок в области ферментов по следующим направлениям [5]: 1. синтез и модификация антибиотиков, стероидов и ароматических веществ; 2. расщепление остаточных пестицидов; 3. фиксация молекулярного азота нитрогеназой; 4. применение иммобилизованных ферментов в промышленности и медицине; 5. использование солнечной энергии; 6. создание биосенсоров. Экономический эффект в ферментной технологии как правило выше в случае включения белка в подложки, а не использование свободных препаратов. Большинство нативных белков, будучи удалёнными из своего естественного природного окружения, становятся весьма лабильными, быстро инактивируясь при повышении температуры, значительном изменении pH, под действием различных химических агентов и т.д. Это обстоятельство во многом препятствует промышленному применению биокатализаторов. Поэтому важное значение приобретает разработка научно обоснованных путей стабилизации ферментов. Существенные успехи в этом направлении достигнуты иммобилизацией. Необходимо, однако, заметить, что, поскольку к настоящему времени многие существенные аспекты механизмов денатурации белков ещё не достаточно ясны, то невозможно указать и на общие пути их стабилизации. Ясно одно, что для повышения устойчивости ферментов во всех применяемых способах защиты от воздействия неблагоприятных факторов необходимо знание природы аминокислотных остатков участков сорбции и каталитического превращения субстратов с тем, чтобы оставить такие участки максимально нетронутыми. Особенно это касается кофермент-содержащих белковых молекул, к числу которых относится ФАД-зависимая алкогольоксидаза.

Неизученность механизма стабилизации алко-

гольоксидазы, при явном её промышленном назначении, определила необходимость выяснения аминокислотного состава активного центра этого фермента.

### Материалы и методы

Алкогольоксидазу получали из дрожжей *Candida boidinii* КД-1 (коллекция Тартусского университета, Эстония). Клетки выращивали в периодическом режиме культивированием на минеральной среде, содержащей в 1 л: 5 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 г  $\text{MgSO}_4$  и 0,1 г  $\text{NaCl}$ . В качестве источника углерода использовали 0,4% (по объёму) метанол [6]. Культивирование осуществляли в колбах при 29°C в условиях постоянной аэрации при скорости потока воздуха 2 л в минуту. Плотность культуры определяли по поглощению суспензии при 623 нм. Клетки от среды культивирования отделяли центрифугированием (3000 об/мин, 15 мин), промывали 20 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7,6, и повторно центрифугировали. Полученную биомассу хранили в замороженном состоянии при -10°C. Все операции по выделению и очистке алкогольоксидазы проводили при 4-6°C.

Активность алкогольоксидазы измеряли в сопряжённой системе по скорости образования  $\text{H}_2\text{O}_2$ , которая в присутствии пероксидазы восстанавливает 2,6-дихлорфенолиндофенол. За обесцвечиванием индикатора следили при 610 нм. Инкубационная смесь содержала: 0,1 мл 0,2 М этанола, 0,06 мл 0,07% 2,6-дихлорфенолиндофенола, 0,03 мл (30 мкг) пероксидазы хрена и бесклеточный (7-9 мкг) экстракт или очищенный (2-4 мкг) препарат фермента. Общий объём доводили 0,02 М Na-фосфатным буфером, pH 7,6, до 1,2 мл, температура смеси 25°C. Активность выражали числом мкмольей  $\text{H}_2\text{O}_2$ , образовавшегося за 1 мин в расчёте на 1 мг белка ферментного препарата. Измерения проводили на спектрофотометре «Specol 221» (Германия).

Чистоту фермента контролировали электрофорезом в градиенте концентрации полиакриламидного геля [2]. Гели фиксировали 5% трихлоруксус-

ной кислотой, окрашивали 1% раствором амидо-черного 10 Б на 7% уксусной кислоте. Для выяснения локализации алкогольоксидазы полоски геля нарезали на сегменты толщиной 1 мм, растирали и помещали в инкубационную смесь для определения ферментативной активности. В присутствии алкогольоксидазы окраска раствора изменялась от темно-синей до темно-коричневой.

Спектры флуоресценции растворов регистрировали на установке СДЛ-2 (Ленинградского оптико-механического объединения). Для коррекции на спектральную чувствительность использовали стандартную вольфрамовую лампу ТРШ-2850. Степень поляризации  $P$  измеряли статически способом [4], вводя коррекцию на различную чувствительность установки при регистрации по разному поляризованных составляющих излучения. Измерение длительности затухания свечения производили на наносекундном импульсном спектрофлуориметре. Длительность импульсов возбуждения составляла  $\sim 1$  нс. Для управления аппаратурой и обработки данных использовали ЭВМ IBM 386ДХ. Анализ кривых затухания, с учётом длительности возбуждающих импульсов и функции отклика системы регистрации (деконволюцию), производили по методу [4]. При учёте зависимости функции отклика системы регистрации от длины волны руководствовались методикой [10]. В качестве эталонных соединений были взяты  $p$ -терфенил и флуоресцеин, имеющие моноэкспоненциальное затухание свечения.

Для определения SH-групп методом Бойера [8] небольшое количество кристаллов  $p$ -хлормеркурибензоата ( $p$ -ХМБ) растворяли в 0,1 мл 0,2 М NaOH и разбавляли 0,05 М Na-фосфатным буфером, pH 7,0, до такой степени, чтобы внесение одной аликвоты реагента создавало его концентрацию, в конечном объеме пробы, эквимолярную содержанию белка в ней. Концентрацию раствора  $p$ -ХМБ определяли, исходя из молярного коэффициента экстинкции при 232 нм и pH 7,0 равного  $1,69 \cdot 10^4$ .  $1 \cdot 10^{-5}$  М раствор алкогольоксидазы в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7,0, титровали добавлением эквимолярных белку аликвот раствора  $p$ -ХМБ (по 0,01 мл в опытную и контрольную кюветы). В качестве контроля служила проба, не содержащая белка. Об образовании меркаптида судили по приросту оптической плотности при 250 нм через 30 мин. от момента внесения каждой аликвоты титрующего раствора. Расчёт связавшихся эквивалентов  $p$ -ХМБ производили по резкому излому кривой титрования.

При изучении роли SH-групп в проявлении активности алкогольоксидазы к ферменту добавляли аликвоты  $p$ -ХМБ с различным молярным соотношением фермент/реагент: 1/1; 1/2; 1/4; 1/6; 1/10; 1/20. После часовой преинкубации смеси при 25° определяли алкогольоксидазную активность по стандартной методике.

Инактивацию фермента диэтилпирокарбонатом (ДЭПК) осуществляли по методу [1], подробно

описанному ранее. Экспериментальные данные обрабатывали методом вариационной статистики. Регрессионный анализ выполняли методом наименьших квадратов.

### Результаты и обсуждение

Наиболее полное представление о функционально значимых аминокислотных остатках активных центров белков обычно можно получить, используя химические реагенты, избирательно контактирующие с этими остатками, блокируя ферментативную активность. Модификация активного центра алкогольоксидазы ДЭПК, в малых количествах действующим преимущественно на гистидиновые и тирозиновые остатки, показала, что потеря активности фермента коррелирует с содержанием инактиватора (рис. 1) и временем контакта с макромолекулой (рис. 2), хотя для достижения эффекта необходимы его достаточно высокие концентрации. Из графика логарифмической зависимости константы скорости псевдопервого порядка от концентрации ДЭПК был оценён порядок реакции,  $n = 1,07$ , что указывает на эквимолярную стехиометрию взаимодействия ДЭПК с алкогольоксидазой.

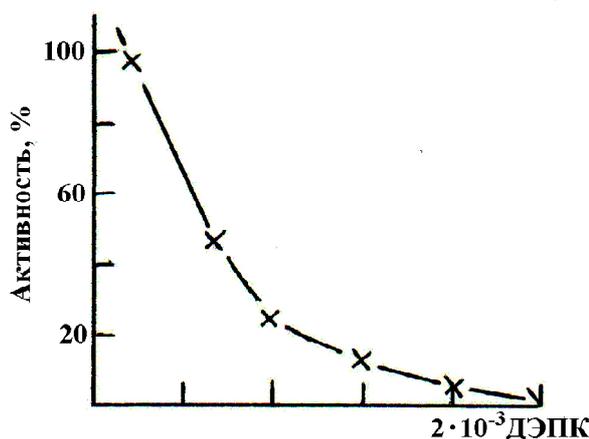


Рисунок 1 - Зависимость начальной скорости алкогольоксидазной реакции от концентрации диэтилпирокарбоната. Концентрация белка 2,4 мкг. Время инкубации 3 мин.

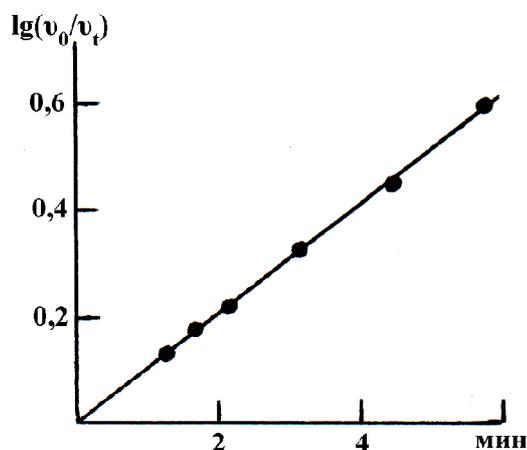


Рисунок 2 - Зависимость степени инактивации алкогольоксидазы от времени контакта с 1,3 мМ диэтилпирокарбонатом. Концентрация белка 2,4 мкг.

Нелинейный ход кривой инактивации ДЭПК (рис. 1) свидетельствует, что в использованных нами условиях, наряду с ковалентной модификацией, происходит образование обратимого комплекса макромолекулы белка с реагентом. Обработка модифицированной, но не полностью утратившей активность, алкогольоксидазы (в попытке реактивировать фермент) раствором 0,2 М гидроксилamina приводила к обратному эффекту: мгновенной инактивации макромолекулы. Такого рода факт обнаружен при модификации ряда белков [9]. Причина этого явления, по мнению авторов, заключается не в модификации гидроксилaminом других функциональных групп, а в том, что в процессе гидроксилaminолиза происходит размыкание имидазольного кольца гистидина и образование производных диамина.

Параллельно с активностью регистрировался дифференциальный спектр поглощения раствора белка, содержащего ДЭПК, против контрольного препарата фермента. Известно, что появление полосы поглощения в области 240 нм свидетельствует об образовании этоксиформилпроизводных гистидина, а падение поглощения при 280 нм – о модификации остатков тирозина (их 0-ацетилировании или 0-алкилировании). Однако мы не наблюдали изменений дифференциальных спектров ни при одной из указанных длин волн. Эти сведения приводят к выводу, что падение активности алкогольоксидазы при воздействии на неё ДЭПК связано с модификацией реагентом не гистидина или тирозина, а других аминокислотных групп.

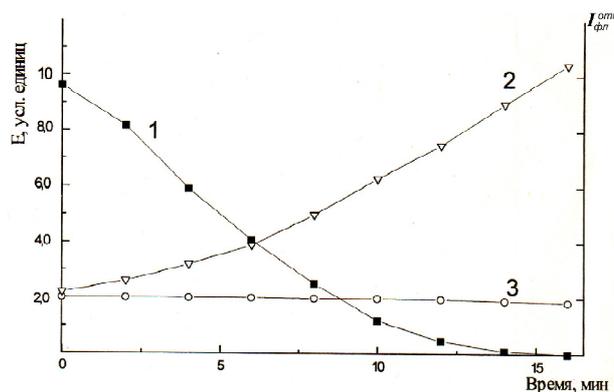
Для технического использования оксидазы важнее было установить не химическую природу функциональных групп, ответственных за активность, а к изменению каких физических параметров приводит процесс модификации: сопровождается ли он какими-либо структурными перестройками белка, важными в его стабилизации. С этой целью было изучено влияние ДЭПК на собственную флуоресценцию алкогольоксидазы ( $\lambda_{\text{возб}} = 295 \text{ нм}$ ) и на флуоресценцию связанного с белком кофермента ФАД ( $\lambda_{\text{возб}} = 450 \text{ нм}$ ). Инкубация фермента с модификатором, приводящая к полной его инактивации, незначительно изменяла интенсивность свечения триптофановых остатков и ФАД. Это указывает (таблица 1), что при этом не происходит глобальных изменений структуры белка, ведущих к разворачиванию (денатурации) глобулы или отщепления от неё кофермента.

При низких концентрациях ДЭПК достаточно специфический реагент на гистидиновые и тирози-

**Таблица 1** - Влияние п-хлормеркурибензоата ( $10^{-2} \text{ М}$ ) и диэтилпирикарбоната ( $2 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ ) на параметры флуоресценции алкогольоксидазы

Образец	$\lambda_{\text{возб}} = 295 \text{ нм}$			$\lambda_{\text{возб}} = 450 \text{ нм}$		
	$I_{\text{ОТН}}$	$\lambda_{\text{макс. нм}}$	$P_{330}$	$I_{\text{ОТН}}$	$\lambda_{\text{макс. нм}}$	$P_{535}$
Алкогольоксидаза	1,00	332	0,20	10	537	0,18
Алкогольоксидаза + п-хлормеркурибензоат	0,80	335,4	0,14	20,0	530	0,02
Алкогольоксидаза + диэтилпирикарбонат	1,07	332	0,17	0,95	532	0,14

новые остатки [3, 7]. Более тщательные исследования, однако, показали [4, 9], что с повышением концентрации в число аминокислотных остатков, с которыми может взаимодействовать этот реагент, помимо упомянутых, включаются ещё и сульфгидрильные группы цистеина. В этой связи, далее мы попытались выяснить функциональную значимость SH-групп и дисульфидных S-S связей в молекуле белка. В качестве реагента был выбран специфический сульфгидрильный реагент – п-хлормеркурибензоат (п-ХМБ). Реакцию вели в аэробных условиях в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7,0. Концентрацию алкогольоксидазы варьировали в пределах 5-10 мкМ, а модификатора – от 0,7 до 0,4 мМ.



**Рисунок 3** - Зависимость активности алкогольоксидазы (кривая 1) и интенсивности флуоресценции ФАД, связанного с нативным (кривая 3) и после модификации п-ХМБ белком (кривая 2), от времени инкубации

На рис. 3 представлено падение ферментативной активности алкогольоксидазы во времени при её инкубации с п-ХМБ (кривая 1). Параллельно, при комнатной температуре, велась синхронная регистрация SH-остатков. Как видно из рисунка, при модификации единственной сульфгидрильной группы падение активности происходит чрезвычайно быстро: через 12-15 мин активность фермента становилась практически равной нулю. Интересно, что предварительная обработка алкогольоксидазы дитиотрейтолом полностью предотвращает инактивацию модификатором. Надо отметить, что увеличение концентрации п-ХМБ не приводило к существенному увеличению числа доступных SH-групп. Даже при титровании сульфгидрильных групп в 8 М мочеvine после 5 суток инкубации обнаруживается всего 3,6 остатка цистеина.

Из приведенных данных очевидно, что функция легко титруемой доступной тиольной группы белка является ключевой в каталитическом акте алкогольоксидазы. Механизм этого процесса удалось прояснить, используя два экспериментальных подхода. Первый – измеряя флуоресцентные характеристики модифицированного реагентом фермента. Оказалось, что степень поляризации флуоресценции алкогольоксидазы при  $\lambda_{\text{возб}} = 450 \text{ нм}$  в этом случае была близка к нулю (таблица). Характер-

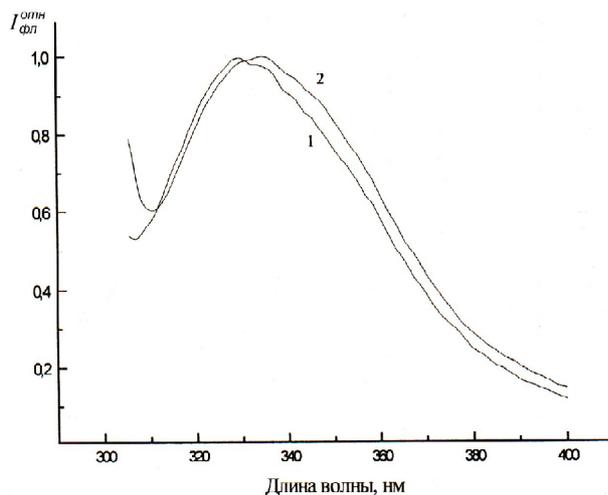


Рисунок 4 - Нормированные спектры триптофановой флуоресценции нативной алкогольоксидазы (1) и при модификации *p*-ХМБ (2).  $\lambda_{\text{возб}} = 295 \text{ нм}$

но, что увеличивающаяся флуоресценция ФАД имеет хорошую корреляцию с падением ферментативной активности (рис. 3, кривые 1,2). Этот факт однозначно свидетельствует об отрыве в процессе модификации кофермента ФАД от белковой молекулы. *p*-ХМБ, кроме того, вызывает изменение динамики и структуры белка. Наблюдаемые нарушения приводят к падению интенсивности триптофановой флуоресценции и уменьшению степени её поляризации (таблица 1, рис. 4).

Флуоресцентные данные были подтверждены и при втором подходе, - при фракционировании модифицированного белка на колонке с сефадексом G-50. Обнаружилось, что после белковой алкогольоксидазной фракции в профиле элюции регистрируется пик, идентифицированный нами как ФАД (рис. 5). Таким образом, выяснен важный для вопроса стабилизации глобулы факт: кофермент привязан к апоформе алкогольоксидазы через сульфгидрильную группу цистеина.

### Выводы

1) гистидиновые и тирозиновые остатки алкогольоксидазы не принимают непосредственного участия в акте ферментативного катализа;

2) активный участок апоформы алкогольоксидазы с коферментом ФАД формируется через сульфгидрильную группу остатка цистеина.

### Литература

1. Аваева, С.М., Реакция диэтилпирикарбоната с имидазолом и производными гистидина / С.М. Аваева, В.И. Краснова // Биооргани. химия. - 1975. - Т. 1, № 11. - С. 1600 - 1605.

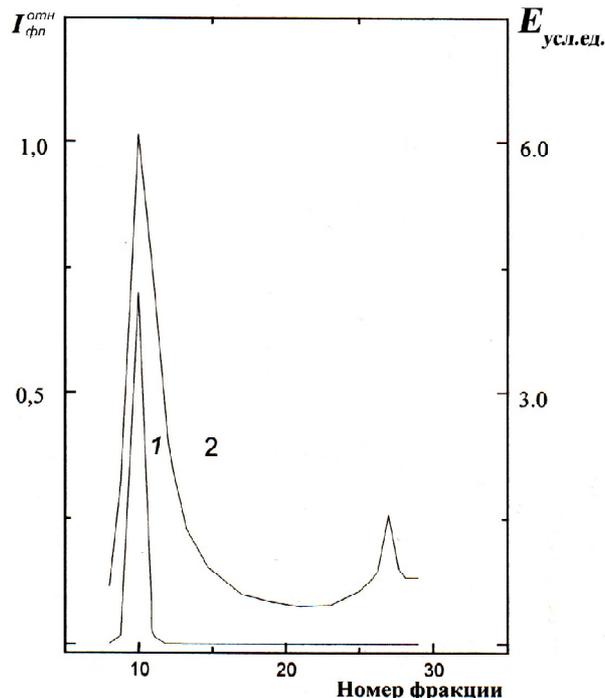


Рисунок 5 - Зависимость активности (1) и интенсивности флуоресценции (2) алкогольоксидазы, модифицированной 0,4 мМ *p*-ХМБ, от номера фракции.  $\lambda_{\text{возб}} = 450 \text{ нм}$

2. Галь, Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медьши, Л. Верецкеи. - М.: Мир, 1982. - 446 с.

3. Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лакович. - М.: Мир, 1986. - 496 с.

4. Флуоресценция алкогольоксидазы из метилотрофных дрожжей / А.А. Маскевич [и др.] // Биоргани. химия. - 1997. - Т. 23, № 6. - С. 479 - 485.

5. Розанов, А.Я. Ферментная технология / А.Я. Розанов - Одесса: Эрудит, 1996. - 296 с.

6. Симискер, Я. Аэробная биодеградация HCO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> / Я. Симискер, Э.Хейнару, Т. Ныгес // Ученые записки Тартусского ГУ. - 1982. - Вып. 624. - С. 21 - 35.

7. Торчинский, Ю.М. Сера в белках / Ю.М. Торчинский - М.: Наука, 1964. - 229 с.

8. Boyer, P.D. A modification of the Ellman procedure for the estimation of protein sulfhydryl groups / P.D. Boyer // J. Amer. Chem. Soc. - 1954. - V. 76. - P 4331 - 4337.

9. Miles, E.W. Modification of essential histidine residues of the B<sub>2</sub> subunit of tryptophan synthetase by photooxidation in the presence of pyridoxal 5'-phosphate and L-serine and by diethylpyrocarbonate / E.W. Miles, H. Kumagai // J. Biol. Chem. - 1974. - V. 249, N 9. - P. 2843 - 2851.

10. Voss, K. Time - correlated Single Photon Counting / K. Voss, A. Hock, A.J. W.G. Visser // Eur. J. Biochem. - 1987. - V. 165. - P. 55 - 63.

Поступила 02.11.07