

УДК 577.1+547.25

## СТАБИЛЬНОСТЬ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ ИЗ *PENICILLIUM FUNICULOSUM G-15*

М. Е. Давыдова,<sup>1</sup> В. С. Курова<sup>2</sup>, М. В. Сухачева<sup>1</sup>, М. Б. Куплетская<sup>1</sup>, А. Д. Рябов<sup>2</sup>,  
А. И. Нетрусов<sup>1</sup>

(Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, <sup>1</sup>биологический факультет, <sup>2</sup>химический факультет; e-mail: kurova@mail.ru)

Изучены свойства глюкозооксидазы (ГО), выделенной из нового штамма плесени *Penicillium funiculosum G-15*. Фермент проявляет высокую субстратную специфичность по отношению к D-глюкозе ( $K_M = 3,3$  мМ) и сохраняет оптимальную активность в широком диапазоне температур и значений pH. Медиаторная активность комплексов рутения(II) в катализе ГО из *P. funiculosum G-15* была сопоставлена с активностью по отношению к ферменту из *A. niger*.

Для создания биосенсоров и ферментных анализаторов в фундаментальной и клинической медицине вот уже два десятка лет используют глюкозооксидазу (КФ 1.1.3.4) [1, 2]. Этот фермент с успехом применяют

также в пищевой промышленности в качестве биологического антиоксиданта и консерванта [1, 3, 4].

Известно, что основными продуцентами фермента являются мицелиальные грибы, относящиеся к родам *Aspergillus* и *Penicillium* [5–8]. Практическая значимость глюкозооксидазы (ГО) обусловила необходимость разработки эффективных способов ее получения и поиска новых продуцентов с высокой биосинтетической активностью.

В настоящей работе была выделена внеклеточная глюкозооксидаза из нового штамма *P. funiculosum G-15*. Она была протестирована на примере системы, включающей в качестве медиаторов электронного переноса комплексы рутения. Были изучены свойства ГО, а также возможность ее использования в создании амперометрических биосенсоров.

### Экспериментальная часть

**Приборы и материалы.** В работе использовали штамм-продуцент внеклеточной глюкозооксидазы *P. funiculosum G-15*, выделенный в 1997 г. М.Б. Куплетской и А.В. Кураковым из испорченной краски [8]. В работе были также использованы ГО из *A. niger (Sigma)* с активностью 270 ед./мг, пероксидаза хрена (RZ > 3,0) (ICN), D-глюкоза (ICN), бычий сывороточный альбумин (БСА) (*Sigma*). Очистку белка проводили на *сефадекс G-150 (Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Швеция)*. Компоненты буферных растворов ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{HCl}$  и  $\text{NaOH}$ ), а также трихлоруксусную кислоту (ТХУ) с чистотой не ниже “ч.д.а.”, использовали без дополнительной очистки. При проведении градиентного электрофореза в качестве калибровочных белков использовали MW маркеры (*Amersham-Pharmacia, Швеция*).

Комплексы рутения типа I были синтезированы А.Ю. Ершовым (*С.-Петербургский государственный университет, Россия*), а рутенациклы предоставлены Л. Александровой (*Carnegie Mellon University, Питтсбург, США*). Спектрофотометрические данные были получены на приборах “Хитачи 200–20” (Япония) “Schimadzu” UV-160A (Япония). Электрохимические измерения проводили на потенциостате – гальваностате ИРС-4, оснащенный компьютерным интерфейсом (*Институт физической химии, РАН, Москва, Россия*). Электрохимическая ячейка включала пирографитовый рабочий электрод, насыщенный каломельный электрод сравнения (НКЭ) и платиновый вспомогательный электрод.

**Методы.** Разработан метод выращивания культуры, выделения и очистки внеклеточной глюкозооксидазы [9]. Экстракцию меланиновых пигментов из культуральной жидкости проводили по методике [10]. Содержание белка в ферментных препаратах определяли по методу Брэдфорда [11]. Количество ФАД на молекулу фермента рассчитывали, учитывая его молярный коэффициент экстинкции при 450 нм  $\epsilon = 1,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ .

Молекулярную массу фермента определяли гель-фильтрацией, используя колонку (2,5×100 см) с *сефадексом G-150 (Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Швеция)* в качестве носителя, и элюировали 0,05 М фосфатным буфером (рН 7,0; 22°) со скоростью 18 мл/ч. Для построения калибровочной кривой использовали смесь белков с известной молекулярной массой (гексокиназа, БСА, химотрипсин – 96,6; 67 и 25 кДа соответственно). Молекулярную массу субъединиц глюкозооксидазы рассчитывали по данным градиентного электрофореза в 4–12%-м полиакрил-амидном геле (ПААГ) с 0,1% додецилсульфата натрия (ДДС–Na) в присутствии калибровочных белковых маркеров после обработки фермента 0,1 М меркаптэтанолом. Чистоту ферментного препарата определяли по градиентному электрофорезу в 4–12%-м ПААГе в нативных условиях.

Ферментативную активность ГО определяли по скорости пероксидазного окисления *o*-дианизидина, согласно стандартной методике [12].

При измерении диапазона рабочей температуры фермента реакционную смесь, содержащую 100 мг/мл D-глюкозы, инкубировали при температурах от 20 до 70° в течение 20 мин. Для определения температурной стабильности и влияния рН на термостабильность глюкозооксидазы исследуемый фермент инкубировали в буферных растворах с рН 5,6; 7,0 и 8,6 в течение 1 ч при температуре от 20 до 70°. Пробы отбирали через каждые 15 мин и измеряли активность фермента описанным выше методом.

Для определения влияния ионов металлов на активность глюкозооксидазы в реакционную смесь, содержащую изучаемый фермент, добавляли соли в концентрации 1 мМ. После инкубирования в течение 5 мин измеряли активность фермента. За 100% принимали активность фермента в контрольной смеси, не содержащей добавок.

Медиаторную активность комплексов рутения (II) при электрокатализе глюкозооксидазой изучали методом циклической вольтамперометрии (ЦВА). Рабочие растворы комплексов рутения(II) с концентрацией 0,4 мМ готовили растворением навески комплекса в соответствующем объеме 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,0; 22°) с добавлением не более 5% MeOH. Исходный 1 М раствор D-глюкозы получали растворением навески глюкозы в фосфатном буфере и выдерживанием раствора при комнатной температуре в течение 24 ч для полной мутаротации D-глюкозы. Раствор глюкозооксидазы в дистиллированной воде (1,3 мМ) хранили при –20°. Раствор комплекса помещали в термостатируемую при 25° электрохимическую ячейку объемом 8 мл и в течение 30 мин продували аргоном, затем добавляли раствор фермента, концентрация которого в ячейке составляла 5 мкМ, и регистрировали циклические вольтамперограммы при скорости развертки потенциала от 2 до

100 мВ/с в диапазоне потенциалов 0–1 В. Затем проводили тот же эксперимент после добавления свежего раствора D-глюкозы, концентрация которой в ячейке составляла 100 мМ. Полученные данные обрабатывали по методу Бурдильона [13].

### Обсуждение результатов

Молекулярная масса глюкозооксидазы из *P. funiculosum*, определенная гель-фильтрацией и методом градиентного электрофореза в 4–12% ПААГе в нативных условиях, составляла  $140 \pm 10$  кДа. На электрофорезе в полиакриламидном геле с 0,1% ДДС–Na после обработки фермента меркаптэтанолом наблюдали одну полосу, подвижность которой соответствовала молекулярной массе 70 кДа. По всей видимости, фермент состоит из двух идентичных субъединиц.

Глюкозооксидаза из *P. funiculosum* характеризуется высокой субстратной специфичностью к D-глюкозе ( $K_m = 3,3$  мМ; pH 7,0; 25°).

Первоначальная активность фермента (100%), при 25° не меняется в диапазоне pH от 6,0 до 8,6 (рис. 1, а), а при повышении температуры от 25 до 55° падает не больше, чем на 20% и достигает максимума при 30° (рис. 1, б).

Инкубирование глюкозооксидазы при 30° в течение 1 ч не влияет на ее стабильность в широком диапазоне значений pH от 4,0 до 8,6 (рис. 2).

При инкубировании в буфере с pH 5,6 фермент сохраняет первоначальную активность при 50° в течение 1 ч, а при 60° – в течение 15 мин, тогда как в буфер-

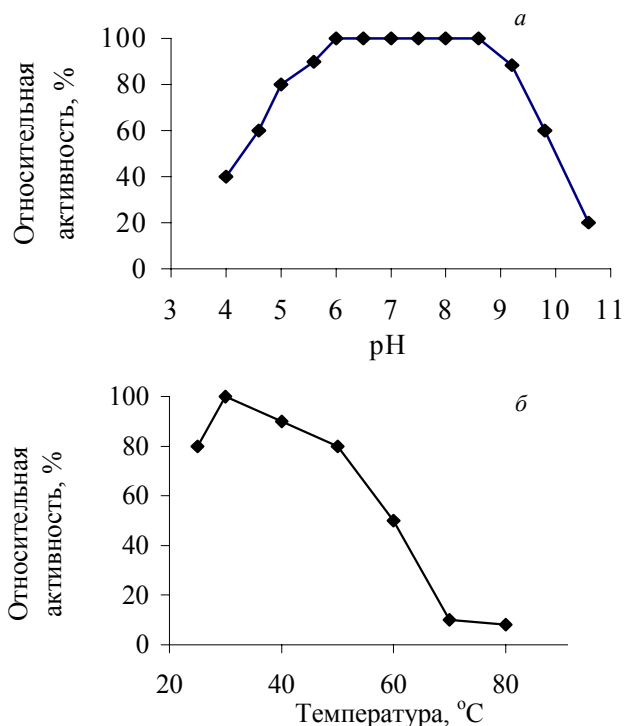


Рис. 1. Оптимум pH (а) и диапазон рабочей температуры (б) глюкозооксидазы из *P. funiculosum* G-15

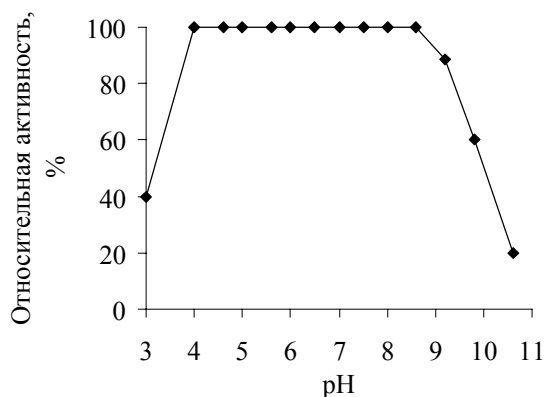


Рис. 2. Влияние pH на стабильность глюкозооксидазы *P. funiculosum* G-15 в точке температурного оптимума

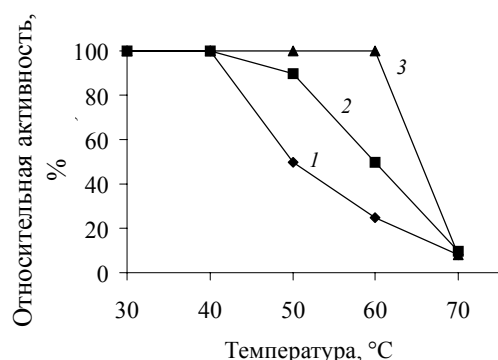


Рис. 3. Влияние температуры на стабильность глюкозооксидазы *P. funiculosum* G-15 при pH: 1 – 8,6; 2 – 7,0; 3 – 5,6

ном растворе с pH 8,6 его активность быстро падает до 50% от первоначальной в диапазоне температур от 40 до 50°. При дальнейшем нагревании в щелочном буфере фермент быстро инактивируется (рис. 3).

Исследуемая глюкозооксидаза устойчива по отношению ко многим ионам металлов за исключением меди(II) и цинка(II) (табл. 1).

Высокая температурная и pH стабильность новой глюкозооксидазы и ее устойчивость к изученным ионам металлов делает ее перспективной для использования в биосенсорах для анализов в медицине и пищевой технологии.

В качестве модели амперометрического биосенсора на основе ГО из *P. funiculosum* нами была изучена методом ЦВА система, состоящая из фермента и комплексов рутения(II) двух типов (рис. 4):

I –  $[\text{Ru}(\text{NN})_2(\text{X})_{1-2}]$  (NN = 2,2'-бипиридил или 1,10-фенантролин; X =  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ , (NO)Cl);

II –  $[\text{Ru}(\text{CN})(\text{NN})(\text{solvent})_2](\text{PF}_6)$  или  $[\text{Ru}(\text{CN})(\text{NN})_2](\text{PF}_6)$ , где CN = N,N-диметилбензиламин или 2-фенилпиридин. Ранее было показано [14–16], что рутениевые комплексы обоих типов проявили высокую медиаторную активность в катализе глюкозооксидазой из *A. niger*. Согласно теории [17], из-за большей жесткости координационной

Т а б л и ц а 1

**Влияние ионов металлов и хелатирующих агентов на активность внеклеточной глюкозооксидазы из *P. funiculosum* G-15**

Добавка, 1 мМ	Относительная активность ГО, %
Контроль	100
NaCl, NaF, NaNO <sub>2</sub> , KI	100
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> , FeCl <sub>3</sub> , MnSO <sub>4</sub>	100
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , CoCl <sub>2</sub>	96
CuSO <sub>4</sub>	70
ZnSO <sub>4</sub>	25

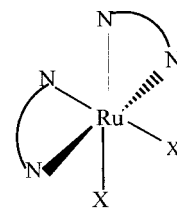
Т а б л и ц а 2

**Медиаторная активность комплексов рутения(III) в каталитической активности глюкозооксидазы из *A. niger* и *P. funiculosum***

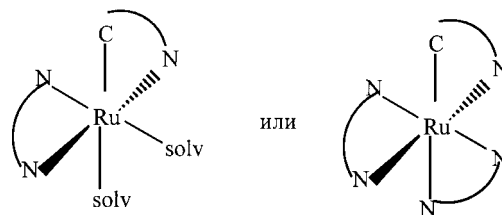
Комплексы в растворе	$k_3, M^{-1}c^{-1}$	
	ГО <i>A. niger</i>	ГО <i>P. funiculosum</i>
[Ru(bpy) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)Cl] <sup>2+</sup>	(0,71±0,10)×10 <sup>5</sup>	(1,00±0,00)×10 <sup>5</sup>
[Ru(phen) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	(0,80±0,01)×10 <sup>5</sup>	(0,80±0,01)×10 <sup>5</sup>
[Ru(bpy) <sub>2</sub> (NO <sub>2</sub> )(H <sub>2</sub> O)] <sup>2+</sup>	(0,70±0,01)×10 <sup>5</sup>	(1,10±0,01)×10 <sup>5</sup>
[Ru(phpy)(phen) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	(7,5±0,3)×10 <sup>6</sup>	(8,7±0,1)×10 <sup>3</sup>
[Ru(dmiba)(bpy)(py) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	(1,8±0,1)×10 <sup>6</sup>	(3,0±0,1)×10 <sup>5</sup>
[Ru(dmiba)(bpy)(MeCN) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	(2,0±0,1)×10 <sup>6</sup>	(4,0±0,0)×10 <sup>5</sup>
[Ru(phpy)(phen)(MeCN) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	(1,7±0,1)×10 <sup>6</sup>	(3,0±0,0)×10 <sup>5</sup>
[Ru(phpy)(Me <sub>2</sub> bpy)(MeCN) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	(2,5±0,1)×10 <sup>6</sup>	(4,0±0,1)×10 <sup>5</sup>

сферы размеры окисленной и восстановленной формы рутенациклов претерпевают меньшие изменения, что повышает их константы скорости самообмена и, как следствие, их медиаторные константы скорости [18]. Для фермента из *A. niger* теория подтверждается экспериментом (табл. 2). Однако в случае фермента из пенициллового штамма был получен неожиданный эффект: медиаторные константы скорости в случае комплексов второго типа оказались на два порядка ниже, чем для ГО из *A. niger*, в то время как для комплексов первого типа значительной разницы не наблюдалось.

Этот факт мы попытались объяснить с точки зрения специфических взаимодействий фермента и координационной сферы комплексов рутения. Например, наиболее



тип I



тип II

Рис. 4. Схема комплексов рутения(II) типов I и II

объемный и гидрофобный среди рассмотренных комплексов [Ru(phpy)(phen)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> при окислении рутения должен характеризоваться наименьшей энергией реорганизации и, следовательно, наибольшей константой электронного переноса. В табл. 2 показано, что его константа  $k_3$ , достигающая в случае фермента из *A. niger* величины порядка 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>c<sup>-1</sup>, для фермента из *P. funiculosum* уменьшается на три порядка. По-видимому, в последнем случае строение белка таково, что стерические затруднения и гидрофобность комплекса нивелируют эффект высоких скоростей самообмена молекулы медиатора и его электростатического притяжения к белку. Комплексы первого типа с меньшей по объему и более мягкой координационной сферой проявили себя менее активными медиаторами обеих ГО, но вместе с тем оказались толерантны к предполагаемой разнице структуры ферментов.

На основе литературных данных [19] была рассмотрена возможность влияния электростатических взаимодействий белка и медиатора. Мы предположили, что причина может заключаться в разнице зарядов белковых глобул. Изоэлектрофокусирование, проведенное для ГО из *P. funiculosum*, показало, что препарат содержит две формы с pI 4.0, которая совпадает с pI глюкозооксидазы из *A. niger* (5.5). Присутствие второй формы понижает в условиях эксперимента долю заряженной ГО в растворе. Вследствие этого, вероятно, снижается влияние электростатического взаимодействия медиатора и фермента на скорость электронного переноса в целом, и возрастает значение гидрофобных взаимодействий медиатора с апо-ферментом, а также геометрии молекулы рутениевого комплекса.

В заключение стоит отметить, что полученная из нового штамма плесени глюкозооксидаза обладает рядом

технических характеристик (повышенной температурной и pH стабильностью), расширяющих область ее применения в биотехнологии. Различие скоростей электрокаталитического окисления D-глюкозы с учас-

тием комплексов рутения(II) и глюкозооксидазы из разных видов плесени указывает, по-видимому, на то, что структуры активных центров этих ферментов отличаются друг от друга.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Godfrey T., West S.* (ed.). *Industrial enzymology*. 2<sup>nd</sup> ed. N.Y., 1996.
2. *Wilson R., Turner A. P. F.* // *Biosens. Bioelectr.* 1992. **7**. С. 165.
3. *Воробьева Л.И.* *Техническая микробиология*. М., 1987.
4. *Кретович В.Л.* *Введение в энзимологию*. М., 1986.
5. *Гулый М. Ф., Билот В. И., Пидопличко Н. М.* *Фермент глюкозооксидаза и его применение*. Киев, 1964.
6. *Абалихина Т. А., Морозкин А. Д., Богданов В. П.* // *Биохимия*. 1971. **36**. С. 191.
7. *Акулова В. Ф., Вайткявичюс Р. К., Куртинайтене Б. С.* // *Прикладная биохимия и микробиология*. 1978. **14**. С. 377.
8. *Куплетская М. Б., Кураков А. В.* // *Прикладная биохимия и микробиология*. 1999. **35**. С. 160.
9. *Давыдова М. Е.* *Глюкозооксидаза из *P. funiculosum* G-15: получение, свойства и перспективы практического применения*. Дипломная работа. М., 2002.
10. *Звягинцев Д. Г.* *Методы почвенной микробиологии и биохимии*. М., 1987.
11. *Bradford M. A.* // *Anal. Biochem.* 1976. **72**. С. 248.
12. *Kenston A. S.* // *Abstracts of papers. 129<sup>th</sup> National meeting of the American Chemical Society, Dallas, TX, paper 31C, American Chemical Society. Washington, DC. 1956.*
13. *Bourdillon C., Demaille C., Moiroux J.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. **115**. P. 2.
14. *Ryabov A. D., Firsova Yu. N., Goral V. N., Sukharev V. S.* // *Inorganic Reaction Mechanisms*. 2000. P. 1.
15. *Курова В. С., Еришов А. Ю., Рябов А. Д.* // *Изв. РАН. Серия химическая*. 2001. **10**. С. 1766.
16. *Ryabov A. D., Sukharev V. S., Alexandrova L., Le Lagadec R., Pfeffer M.* // *Inorg. Chem.* 2001. **40**. P. 6530.
17. *Dubs R. V., Gahan L. R., Sargeson A. M.* // *Inorg. Chem.* 1983. **22**. P. 2523.
18. *Marcus R. A., Sutin N.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1985. **811**. P. 265.
19. *Zakeeruddin S. M., Fraser D. M., Nazeeruddin M.-K., Grutzel M.* // *J. Electroanal. Chem.* 1993. **359**. P. 125.

Поступила в редакцию 25.10.02