

УДК 577.15.02

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ pH НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ ИЗ *Alcaligenes faecalis*

А.В. Степашкина¹, А.С. Ясная^{2,3}, А.И. Березин^{1,3}, В.И. Тишков^{1,2,3}

(¹кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; ²Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН; ³ООО "Инновации и высокие технологии МГУ"; e-mail: vitishkov@gmail.com)

Пенициллинацилаза G (ПА, КФ 3.5.1.11) из бактерий *Alcaligenes faecalis* является одной из наиболее стабильных бактериальных пенициллинацилаз, однако в литературе отсутствуют систематические данные о ее термостабильности. Нами проведено систематическое исследование зависимости кинетики термоинактивации АfПА от pH. Показано, что во всем исследованном диапазоне pH 7,5–9,5 сохраняется первый порядок реакции инактивации. Зависимость константы скорости инактивации от pH имеет S-образный вид с перегибом в районе pH 8,3–8,5. Из температурных зависимостей константы скорости инактивации для четырех значений pH рассчитаны активационные параметры ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger процесса термоинактивации. Получена зависимость констант скорости инактивации и активационных параметров для четырех значений pH. Уменьшение значений ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger с ростом pH свидетельствует о наличии в белковой глобуле как минимум одной ионогенной группы, существенной для термостабильности фермента.

Ключевые слова: пенициллинацилаза, *Alcaligenes faecalis*, термостабильность, pH, инактивация.

Пенициллинацилаза (ПА) относится к суперсемейству ферментов с N-концевым нуклеофилом (Ntp-гидролазы), которые активируются посредством оригинального автокаталитического расщепления неактивного полипептидного предшественника [1]. ПА за счет широкой субстратной специфичности и высокой стереоселективности находит широкое применение при производстве антибиотиков пенициллинового и цефалоспоринового ряда, в тонком органическом синтезе и при получении оптически чистых соединений [2–4].

ПА из бактерий *Alcaligenes faecalis* (АfПА) – одна из самых термостабильных пенициллинацилаз [5], однако опубликованные данные о термостабильности этого фермента ограничиваются значениями времени полуинактивации для двух-трех температур. Ранее в нашей лаборатории был клонирован и экспрессирован в *E. coli* ген АфПА из штамма *Alcaligenes faecalis* VKM-B1518 [6]. Результаты предварительных экспериментов при pH 8,0 свидетельствуют, что инактивация фермента протекает по мономолекулярному механизму. Мы также показали, что для расчета активационных параметров процесса инактивации ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger может быть использована теория активированного комплекса. Для эффективного применения фермента на практике необходима более подробная информация о зависимости стабильности фермента от таких параметров, как температура и

pH раствора. Данная работа посвящена систематическому исследованию влияния pH на термостабильность АфПА в диапазоне температур 49–54°C.

Экспериментальная часть

Культивирование. Нарработку биомассы клеток *E. coli* с рекомбинантной АфПА проводили в качелочных колбах объемом 1 л, содержащих 2 или 4 отбойника на шейкере "Multitron" ("Infors", Швейцария). Рабочие объемы среды YE++ (30 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л хлорида натрия, 5 г/л глицерина, 2 мМ хлорида кальция; pH 7,5) составляли 100 мл. Посевной материал растили в течение ночи (37°C, 180 об/мин). Среда содержала 35 мкг/мл хлорамфеникола. В качестве индуктора биосинтеза белка использовали изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ, конечная концентрация составляла 0,1 мМ), который добавляли после достижения суспензией клеток величины поглощения на 600 нм 0,6–0,8 (A_{600}). Далее клетки культивировали еще 55–60 ч при 15–17°C. Клетки осаждали центрифугированием (7500 об/мин, 20 мин, 4°C) на центрифуге "Beckman J-21" (Германия).

Выделение и очистка фермента. Процедура выделения и очистки рекомбинантной АфПА включала разрушение бактериальных клеток методом осмотического шока, фракционирование сульфатом аммония (35–65% от насыщения) и обессоливание

на колонке с Сефадексом G 25 (“Amersham Biosciences”, Швеция). В качестве обессоливающего буфера использовали 0,1 М Tris-HCl, доведенный до соответствующего значения pH в диапазоне от 7,5 до 9,5 ед. Контроль чистоты осуществляли с помощью аналитического электрофореза в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (аппаратура для электрофореза фирмы BioRad). Чистота полученных ферментных препаратов составила не менее 90%.

Определение ферментативной активности.

Активность AfPA определяли спектрофотометрически по накоплению хромофора в процессе гидролиза 0,24 мМ раствора *n*-нитро-*m*-карбоксианилида фенилуксусной кислоты (NIPAB) при 400 нм на спектрофотометре “UV-1601” (“Shimadzu”, Япония). Реакцию проводили при 30°C в 0,01 М фосфатном буфере (pH 8,0; 0,1 М KCl).

Изучение термостабильности. Для исследования термостабильности проводили серию экспериментов по определению зависимости остаточной активности фермента от времени в соответствующем буфере. Для проведения эксперимента готовили серию из двадцати пластиковых пробирок объемом 500 мкл, в которых находилось по 50 мкл фермента. Пробирки помещали в водяной термостат, нагретый до нужной температуры (точность термостатирования ±0,1°C), и через определенные промежутки времени отбирали по две пробирки. Интервал между отборами проб определяли такой, чтобы общее время проведения эксперимента составляло три периода полуинактивации. Пробирки для охлаждения помещали на 1 мин в лед с водой, затем центрифугировали в течение 2 мин при 14000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5415D для удаления осадка. Затем из пробирки отбирали пробы по 20 мкл и измеряли величину остаточной ферментативной активности, как описано выше.

Константы скорости термоинактивации k_{in} определяли по тангенсу угла наклона прямой графика зависимости натурального логарифма величины относительной остаточной активности от времени ($\ln(A/A_0) - t$) методом линейной регрессии с помощью программы “OriginPro 7,0”.

Обсуждение результатов

Кинетика инактивации рекомбинантной AfPA была исследована при трех значениях температуры 49, 52 и 54°C в интервале pH от 7,5 до 9,5 ед. Исследование зависимости активности AfPA от pH в диапазоне 7,5–9,5 показало, что в данном интервале активность фермента постоянна. На рис. 1, а, б представлена

зависимость величины остаточной активности фермента от времени при 49°C и четырех значениях pH в простых и полулогарифмических координатах. Оказалось, что при всех изученных значениях pH эти зависимости в полулогарифмических координатах $\ln(A/A_0)-t$ представляют собой прямые, т.е. фермент инактивируется в соответствии с кинетикой реакции первого порядка. По тангенсу угла наклона были определены величины констант скорости инактивации первого порядка. Аналогичные зависимости были получены и для двух других температур. В табл. 1 приведены численные значения констант скорости инактивации. На рис. 2 приведены зависимости этих констант от pH при различных температурах. Как видно из графика, с ростом pH раствора константа скорости инактивации увеличивается (стабильность фермента падает), причем на зависимостях для температур 52 и 54°C хорошо виден изгиб в районе pH 8,3–8,5. Наличие такого изгиба означает, что при повышении pH

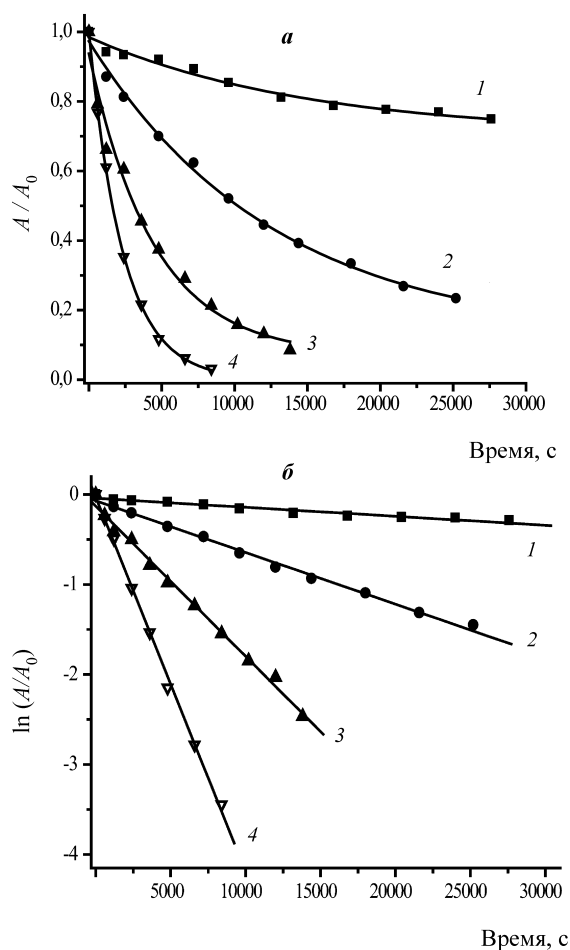


Рис. 1. Инактивация пенициллинацилазы из бактерий *A. faecalis* при 49°C в 0,1 М Tris-HCl буфере при разных значениях pH (1 – 7,5; 2 – 8,0; 3 – 8,5; 4 – 9,5); зависимость остаточной активности от времени: а – в координатах A/A_0-t ; б – в полулогарифмических координатах

Т а б л и ц а 1

Константы скорости термоинактивации пенициллинацилазы при разных значениях рН и температуры

Буферный раствор	Tris-HCl рН 7,5	Tris-HCl рН 8,0	Tris-HCl рН 8,5	Tris-HCl рН 9,5
49°C				
k_{in}, c^{-1}	$(9,90 \pm 0,80) \cdot 10^{-6}$	$(5,75 \pm 0,15) \cdot 10^{-5}$	$(1,67 \pm 0,04) \cdot 10^{-4}$	$(4,16 \pm 0,08) \cdot 10^{-4}$
52°C				
k_{in}, c^{-1}	$(1,28 \pm 0,01) \cdot 10^{-4}$	$(5,69 \pm 0,16) \cdot 10^{-4}$	$(1,61 \pm 0,03) \cdot 10^{-3}$	$(3,11 \pm 0,03) \cdot 10^{-3}$
54°C				
k_{in}, c^{-1}	$(5,53 \pm 0,09) \cdot 10^{-4}$	$(2,16 \pm 0,02) \cdot 10^{-3}$	$(4,61 \pm 0,16) \cdot 10^{-3}$	$(6,24 \pm 0,14) \cdot 10^{-3}$

одна форма фермента переходит в другую. Этот переход, по всей вероятности, может быть обусловлен

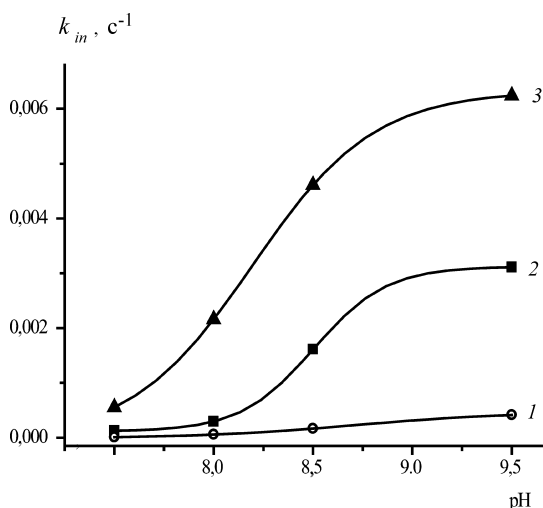


Рис. 2. Зависимость величины константы скорости инактивации от рН (0,1 М Tris-HCl) при разных значениях температуры, °С: 1 – 49, 2 – 52, 3 – 54

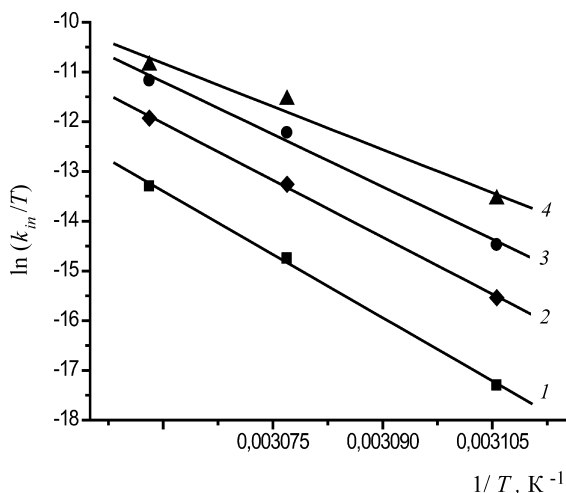


Рис. 3. Зависимость константы скорости инактивации от температуры в координатах $\ln(k_{in}/T) - 1/T, K^{-1}$ при разных значениях рН: 1 – 7,5; 2 – 8,0; 3 – 8,5; 4 – 9,5

депротонированием какой-то группы фермента, в результате чего стабильность пенициллинацилазы падает. Наиболее близкие значения рК к наблюдаемому значению точки перегиба имеют сульфгидрильная группа остатка цистеина (8,5–9,0) и аминогруппа остатка лизина (9,0–9,5). Поскольку в А/ПА нет свободных сульфгидрильных групп (в белковой глобуле имеется всего два остатка цистеина, которые связаны между собой дисульфидной связью) [5], то наиболее вероятным кандидатом является аминогруппа остатка лизина.

Истинно мономолекулярный характер процесса инактивации во всем диапазоне исследованных температур позволяет применить теорию активированного комплекса для его анализа. Согласно теории активированного комплекса (ТАК), уравнение зависимости наблюдаемой константы скорости термоинактивации от температуры имеет следующий вид:

$$\tau = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R_e} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}}$$

Это уравнение можно представить в линейной форме:

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} = \text{const} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T},$$

где

$$\text{const} = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}.$$

В этом случае экспериментальная зависимость в координатах $\ln(k_{in}/T) - 1/T, K^{-1}$ будет представлять собой прямую с тангенсом угла наклона, равным $\Delta H^\ddagger/R$ (рис. 3). Величина ΔS^\ddagger может быть получена ап-

проксимацией прямой на рис. 3 на нулевое значение оси ординат. На рис. 3 хорошо видно, что для всех изученных значений pH зависимость константы скорости инактивации действительно описывается уравнением ТАК.

Значения активационных параметров процесса термоинактивации АfПА представлены в табл. 2. Высокие значения энтальпии и энтропии активации свидетельствуют о том, что инактивация фермента при повышенных температурах связана с денатурацией молекулы белка. Из табл. 2 также видно, что при повышении pH наблюдается уменьшение значения как энтропии, так и энтальпии активации. Это может быть связано с потерей заряда аминогруппы одного из остатков лизина, который может взаимодействовать с карбоксильной группой остатка аспарагиновой или глутаминовой кислоты.

Таблица 2

Значения активационных параметров процесса термоинактивации АfПА при разных значениях pH (0,1 М ТрисHCl)

pH	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/моль
7,5	705±26	1848±83
8,0	635±21	1644±63
8,5	585±52	1499±166
9,5	480±75	1182±233

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 10-04-01334-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ignatova Z., Wischniewski F., Notbohm H., Kasche V. // J. Mol. Biology 2005. **348**. P. 999.
2. Svedas V. K., Savchenko M. V., Beltser A. I., Guranda D. F. // Ann. N.Y. Acad. Science. 1996. **799**. P. 659.
3. Svedas V. K., Beltser A. I. // Ann. N. Y. Acad. Science. 1998. **864**. P. 524.
4. Youshko M.I., van Langen L.M., de Vroom E., van Rantwijk F., Sheldon R.A., Svedas V. K. // Biotechnol. Bioengineering 2001. **73**. P. 426.
5. Verhaert R.M., Riemens A. M., van der Laan J. M., van Duin J., Quax W.J. // Appl. Environ. Microbiology. 1997. **63**. P. 3412.
6. Yasnaya A.S., Panin N.V., Berezin A.I., Svedas V.K., Tishkov V.I. // Biochimie. 2010 (to be published).

Поступила в редакцию 20.01.10

INFLUENCE OF pH ON THERMAL STABILITY OF PENICILLIN ACYLASE FROM *Alcaligenes faecalis*

A.V. Stepashkina, A.S. Yasnaya, A.I. Berezin, V.I. Tishkov

(Division of Chemical Enzymology)

Penicillin G acylase (PA, EC 3.5.1.11) from *Alcaligenes faecalis* (AfPA) is one of the most thermostable bacterial penicillin acylases. However the systematic data about thermal stability of AfPA are not presented in literature. Systematic study of influence of pH on thermal stability of AfPA was done in pH range 7.5–9.5. It was found that in all pH range studied enzyme inactivation follows the first order kinetics. Dependence of inactivation rate constant on pH has S-shape with inflection point at pH 8.3–8.5. Temperature dependences of inactivation rate constant at four pH were obtained and activation parameters ΔH^\ddagger and ΔS^\ddagger were calculated for each pH value. Decrease of both values, ΔH^\ddagger and ΔS^\ddagger , with pH growth shows that minimum one iogenic group is essential for the enzyme thermal stability.

Key words: penicillin acylase, *Alcaligenes faecalis*, thermal stability, pH, inactivation.

Сведения об авторах: Степашикина Анастасия Владимировна – студентка химического факультета МГУ (vitishkov@gmail.com); Ясная Анна Сергеевна – мл. науч. сотр. Института биохимии им.А.Н. Баха РАН, канд. хим. наук (anna.yasnaya@gmail.com); Березин Андрей Игоревич – студент химического факультета МГУ (vitishkov@gmail.com); Тишков Владимир Иванович – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им.А.Н.Баха РАН, докт. хим. наук (vitishkov@gmail.com).