

УДК 663.031.1

А.П. Петросьянц

Одеська національна академія харчових технологій, вул. Канатна, 112, Одеса, 65039, Україна,
тел.: (048) 712 42 68, e-mail: arsenico78@mail.ru

ВИДІЛЕННЯ α -ГАЛАКТОЗИДАЗИ З *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* ЛМ-6 ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ГРУП КАТАЛІТИЧНОГО ЦЕНТРУ ФЕРМЕНТУ

Мета. Виділення α -галактозидази з *Bifidobacterium longum* ЛМ-6. Ідентифікація функціональних груп каталітичного центру ферменту. **Методи.** Мікробіологічні – для культивування та накопичення біомаси біфідобактерій. Біотехнологічні – для ідентифікації функціональних груп каталітичного центру гідролітичного ферменту. **Результати.** За матеріалами дослідження отриманий безклітинний екстракт ферменту α -галактозидази, також встановлена його активність. Проведено очищення ферменту. Ідентифіковані функціональні групи каталітичного центру α -галактозидази *Bifidobacterium longum* ЛМ-6. Встановлено, що в активному центрі α -галактозидази *Bifidobacterium longum* ЛМ-6 присутні карбоксильна та імідазольна групи білків, які відіграють певну роль у гідролізі галактоолігоцукридів. **Висновки.** Вперше ідентифіковані функціональні групи каталітичного центру ферменту α -галактозидази *Bifidobacterium longum* ЛМ-6. Встановлено, що в активному центрі α -галактозидази *Bifidobacterium longum* ЛМ-6 присутні карбоксильна та імідазольна групи білків.

Ключові слова: функціональні групи, каталітичний центр, α -галактозидаза *Bifidobacterium longum* ЛМ-6.

Розвиток біотехнології великою мірою визначається дослідженнями в галузі інженерної ензимології. Завдяки досягненням у цій галузі прикладної біотехнології розв'язуються такі проблеми, як ліквідація дефіциту продуктів харчування, лікувальних засобів, охорона навколишнього середовища. Важливою задачею застосування ферментів є удосконалення технологій виготовлення продуктів харчування, їх якості і безпечності.

В останні роки особливе місце в структурі харчування посідають соєві продукти, розвиваються нові технології з використанням ферментів. Серед гідролаз, що знайшли застосування в цьому напрямі, важливе місце посідають карбогідрази (о-глікозидгідролази, КФ 3.2.1.), які здійснюють гідроліз оліго- та поліцукридів.

Типовий фермент цього класу – α -галактозидаза (3.2.1.22) – відноситься до глікозидаз. Фермент здійснює гідроліз α -1,6-D-галактозидних зв'язків, відщеплюючи галактозидні залишки з нередукувального кінця галактоолігоцукридів [1]. При цьому розщеплюється зв'язок між C_1 атомом залишку галактози і глікозидним атомом кисню [2].

© А.П. Петросьянц, 2016



Активними продуцентами α -галактозидази є рослини, бактерії, гриби [3]. α -галактозидази – ефективні каталізатори, які здійснюють з майже 100%-вим виходом і з великою швидкістю гідролітичну реакцію.

Хоча фізико-хімічні властивості більшості карбоксигідролаз добре вивчені, механізм їх дії здебільшого не з'ясований. Доступних відомостей про будову каталітичного центру α -галактозидаз практично немає, особливо це стосується ідентифікації функціональних груп каталітичного центру α -галактозидаз, виділених з мікробів.

Мета роботи: виділити фермент α -галактозидазу з *Bifidobacterium longum* ЛМ-6 та ідентифікувати функціональні групи каталітичного центру α -галактозидаз.

Матеріали та методи дослідження

Проведені дослідження з ідентифікації функціональних груп α -галактозидази, виділеної з *Bifidobacterium longum* ЛМ-6 [4]. Даний штам отримано з колекції мікроорганізмів кафедри біохімії, мікробіології та фізіології харчування, Одеської національної академії харчових технологій. Культивування мікробів здійснювали на середовищі Блаурокка і середовищі MRS (De Man, Rogosa, Sharpe). Активність оцінювали за вимірюванням адсорбції *p*-нітрофенолу, який утворюється внаслідок дії на *p*-нітрофеніл α -D-галактопіранозид за довжини хвилі 400 нм [5]. Дезінтеграцію клітин здійснювали на приладі УЗДН-А (диспергатор ультразвуковий).

Для отримання безклітинного екстракту сиру біомасу суспендували у 0,07 М фосфатному буфері (рН 7,4), якій містить 5м М₂-меркаптоетанолу, механічно руйнували клітини в дезінтеграторі протягом 10 хвилин і центрифугували гомогенат при 30 000 g протягом 30 хвилин. Отриману надосадову рідину використовували як безклітинний екстракт.

Осідання ферменту з екстракту проводили етанолом або *n*-пропанолом при 4 °С. Для формування осаду суміш витримували 30 хвилин. Осад відділяли на рефрижераторній центрифугі та висушували ліофільно. Потім осад розчиняли у мінімальному об'ємі фосфатно-цитратного буфера (рН 4,5) та здійснювали висолювання сульфатом амонію при наповнюванні 55–56%.

Подальше очищення проводили гель-фільтрацією на сефадексі G-25 фірми Pharmacia. Розчин ферменту наносили на колонку (1,6x65 см) та елюювали фосфатно-цитратним буфером (0,15 моль/дм³) рН 4,5 зі швидкістю 30–35 см³/год протягом однієї години. Фракції елюату (6 см³) збирали за допомогою колектора фракцій та визначали в них місткість білка за методом Лоурі, а також активність α -галактозидази. Потім фермент очищували гель-фільтрацією на колонці з сефадексом G-100 (2,5x35 см). Елюювання проводили тим же буферним розчином зі швидкістю 8–10 см³/год протягом 30 хвилин.

Гомогенність ферменту визначали методом електрофорезу у ПААГ. Електрофорез проводили у 7,5% гелі при рН 7,5 (трис-гліциновий буфер) протягом 2,5–3,5 годин за напруги 260 В та силі струму 5 мА. Для забарвлення гелів використовували барвник 10% амідочорний 10 В. При визначення мо-



лекулярної маси α -галактозидази методом гель-фільтрації на колонці з сефадексом G-200 використовували білки-маркери: сироватковий альбумін (70 кДа) та γ -глобулін (23 кДа) за допомогою блакитного декстрану. Молекулярна маса α -галактозидази дорівнює 112 кДа. Отриманий фермент шляхом висолювання сульфатом амонію з подальшою гель-фільтрацією на сефадексі G-25 та G-100 підлягав 70-разовому очищенню, питома активність склала 422,9 од/мг. При електофорезі фермент був гомогенним.

Результати та обговорення

Для характеристики функціональних груп активного центру α -галактозидази використали декілька методів (метод визначення дисоціації іонних груп, метод розрахування теплоти іонізації карбоксильної та імідазольної груп), які дозволили ідентифікувати хімічну природу цих груп.

На рис. 1 представлені криві залежності $V=f(\text{pH})$, отримані за гідролізу рафінози (2од. на 150 мг, за $T=10$ і 30 °C та оптимальному pH 6,0). Профіль кривих «активність – pH» має екстремальний характер. Форми гілок кривих характерні для дисоціації іонних груп. Присутність «кислої» (верхня крива) та «лужної» (нижня крива) кривих свідчить про участь у розриві α -1,6-глікозидних зв'язків у рафінози двох каталітично активних груп амінокислот.

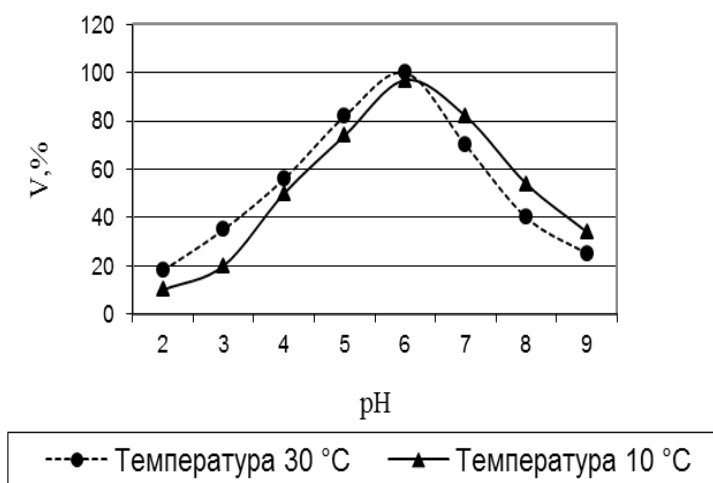


Рис. 1. Залежність активності α -галактозидази від pH при різних температурах.

Примітка: V – активність ферменту.

Fig. 1. Dependence of activity of α -galactosidase from pH at various temperatures.

Note: V – enzyme activity

Математичне описання гілок кривих може бути представленим у вигляді таких рівнянь: для гілки, що йде догори (1):

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + 10^{\text{pK}_1 - \text{pH}}}$$

для гілки, що йде донизу (2):

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + 10^{pH - pK_2}}$$

де V – активність ферменту за повного наповнення його субстратом,
 V_{\max} – активність ферменту за оптимального рН,
 K_1 і K_2 – константи дисоціації каталітично активних груп α -галактозидази.
 З рівнянь (1) і (2) впливає, що $V = V_{\max} / 2$ при $pH = pK_1$

Таким чином, пряма проведена на графіку $V=f(pH)$, паралельно вісі абсцис на відстані $V_{\max} / 2$, дає точки перетину на гілках кривих, що відповідають рК каталітично активних груп. Як видно з рис. 1, вони відповідають карбоксильній та імідазольній групам білків.

Для теоретичної кривої $pH_{\text{опт}} = (pK_1 + pK_2) / 2$. Теоретичні значення $pH_{\text{опт}}$ зараховані за pK_1 і pK_2 , а також отримані експериментально, вельми близькі між собою – $pH_{\text{опт. за } 30^\circ C} = 5,7$; $pH_{\text{опт. за } 10^\circ C} = 6,0$. Це свідчить про те, що залежність $V=f(pH)$ визначається іонізацією функціональних груп ферменту α -галактозидази.

Для підтвердження участі карбоксильних та імідазольних груп, що беруть участь у розриві α -1,6-глікозидних зв'язків у рафінозі, розраховали теплоту іонізації цих груп (ΔH) за рівнянням Вант-Гоффа:

$$\Delta H = 2,303 \times R \times (pK_2 + pK_1) \times \frac{T_1 + T_2}{T_2 - T_1}$$

де ΔH – теплота іонізації;

R – газова стала, що дорівнює $8,315 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$;

pK_1 – константа іонізації за $T=10^\circ C$;

pK_2 – константа іонізації за $T=30^\circ C$.

Розраховані значення величин рН та ΔH представлені в табл. 1.

Таблиця 1

**Теплота іонізації каталітично активних груп
 α - галактозидази *B. longum* ЛМ-6**

Table 1

**Warmth of ionization catalytically active groups
 α -galactosidase *B. longum* ЛМ-6**

| Гілки кривої | рК | | ΔpK | ΔH , к Дж/моль |
|--------------|------|------|-------------|---------------------------|
| | 10° | 30° | | |
| Вверх | 4,03 | 3,91 | 0,12 | 9,84 |
| Вниз | 8,00 | 7,49 | 0,51 | 41,82 |

$$\Delta H_{\text{вверх}} = 2,303 \times 8,315 \times 0,12 \times \frac{283 \times 303}{20} = 9,84 \text{ кДж/моль}$$



$$\Delta H_{\text{вниз}} = 2,303 \times 8,315 \times 0,51 \times \sqrt{\frac{283 \times 303}{20}} = 41,82 \text{ кДж/моль}$$

Величини pK_1 та pK_2 визначені за зсувом гілок $V=f(pH)$, за різних температур. Як виходить з даних таблиці 1 значення ΔH відповідають карбоксильним та імідазольним групам, що є важливим критерієм ідентифікації функціональних груп активного центру ферменту [6].

В результаті досліджень вперше ідентифіковані функціональні групи каталітичного центру ферменту α -галактозидази *Bifidobacterium longum* ЛМ-6; встановлено, що в активному центрі ферменту α -галактозидази *Bifidobacterium longum* ЛМ-6 існує карбоксильна та імідазольна групи білків.

УДК 663.031.1

A.P. Petrosyants

Odesa National Academy of Food Technologies, 112, Kanatna st., Odesa, 65039, Ukraine,
tel.: (048) 712 42 68, e-mail: arsenico78@mail.ru

ISOLATION OF AN α -GALACTOSIDASE FROM BIFIDOBACTERIUM LONGUM ЛМ-6 AND IDENTIFICATION OF FUNCTIONAL GROUPS OF THE CATALYTIC CENTER OF ENZYME

Summary

Aim. Receiving enzyme of an α -galactosidase of *Bifidobacterium longum* ЛМ-6. Identification of the functional groups of the catalytic site of the enzyme. **Methods.** Cultivation and accumulation of biomass of bifidobacteria. Identification of functional groups of the catalytic center of hydrolytic enzyme. **Results.** On acellular extract of enzyme of an α -galactosidase has been received, based on research and also activity of the studied enzyme is defined. The purification of the enzyme by means of the various organic solvents is carried out. The functional groups of the catalytic center of an α -galactosidase *Bifidobacterium longum* ЛМ-6 have been identified. It is established that at the active center of an α -galactosidase *Bifidobacterium longum* ЛМ-6 there are carboxyl and imidazolny groups of proteins, which take part in hydrolysis of galaktooligosakharid. **Conclusions.** The functional groups of the catalytic site of an α -galactosidase *Bifidobacterium longum* ЛМ-6 are identified for the first time. It is established that at the active center of an α -galactosidase *Bifidobacterium longum* ЛМ-6 there are carboxyl and imidazolny groups of proteins.

Key words: functional groups, catalytic center, α -galactosidase, *Bifidobacterium longum* ЛМ-6.



УДК 663.031.1

А.П. Петросьянц

Одесская национальная академия пищевых технологий,
ул. Канатная, 112, Одесса, 65039, Украина, тел.: (048) 712 42 68,
e-mail: arsenico78@mail.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ α -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ ИЗ *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* ЛМ-6, И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП КАТАЛИТИЧЕСКОГО ЦЕНТРА ФЕРМЕНТА

Реферат

Цель. Получение фермента α -галактозидазы *Bifidobacterium longum* ЛМ-6. Идентификация функциональных групп каталитического центра фермента.

Методы. Микробиологические – для культивирования и накопления биомассы бифидобактерий. Биотехнологические – для идентифицирования функциональных групп каталитического центра гидролитического фермента. **Результаты.** По материалам исследования был получен безклеточный экстракт фермента α -галактозидазы, так же была определена активность фермента. Была проведена очистка фермента при помощи различных органических растворителей. Произведена идентификация функциональных групп каталитического центра фермента α -галактозидазы *Bifidobacterium longum* ЛМ-6. Установлено, что в активном центре исследуемого фермента присутствуют карбоксильная и имидазольная группы белков, которые участвуют в гидролизе галактоолигосахаридов. **Выводы.** Впервые идентифицированы функциональные группы каталитического центра фермента α -галактозидазы *Bifidobacterium longum* ЛМ-6. Установлено, что в активном центре исследуемого фермента присутствуют карбоксильная и имидазольная группы белков.

Ключевые слова: функциональные группы, каталитический центр, α -галактозидаза, *Bifidobacterium longum* ЛМ-6.

Список використаної літератури

1. Goulas T., Goulas A., Tzortzis G., Gibson G.R. A novel alpha-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* with transgalactosylating properties, gene molecular cloning and heterologous expression // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2009. – № 82. – P. 471–477.
2. O'Connell K.J., O'Connell Motherway M., O'Callaghan J., Fitzgerald G.F., Ross R.P., Ventura M., Stanton C., van Sinderen D. Metabolism of four α -glycosidic linkage-containing oligosaccharides by *Bifidobacterium breve* UCC2003 // *Appl. Environ Microbiol.* – 2013. – № 79. – P. 6280–6292.
3. Варбанец Л.Д., Борзова Н.В. Использование методов химической модификации для стабилизации грибных гликозидаз // «*Біотехнологія*». – 2011. – Т. 4. – № 6. – С. 36–41.
4. Капрельяню Л.В., Петросьянц А.П. Ферментативный гидролиз галактоолигосахаридов // *Биотехнология – состояние и перспективы развития: материалы Первого Международного конгресса, Москва, 14-18 окт. 2002 г.* – М., 2002. – С. 380–381.



5. Underkofler L.A., Wulf M.L. Isolation and characterization of alpha-galactosidase from *Pichia guilliermondii* // Society for Industrial Microbiology. – 2000. – Vol. 21, Ch.35. – P. 339–348.

6. Корнеева О.С., Жеребцов Н.А., Черемушкина И. Идентификация каталитически активных групп // Биохимия. – 2001. – Вып. 3 – С. 412–418.

References

1. Goulas T, Goulas A, Tzortzis G, Gibson GR. A novel alpha-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* with transgalactosylating properties, gene molecular cloning and heterologous expression. // Appl Microbiol Biotechnol. – 2009. – № 82. – p. 471-477.

2. O’Connell KJ, O’Connell Motherway M, O’Callaghan J, Fitzgerald GF, Ross RP, Ventura M, Stanton C, van Sinderen D. Metabolism of four α -glycosidic linkage-containing oligosaccharides by *Bifidobacterium breve* UCC2003. // Appl Environ Microbiol. – 2013. – №79. – p. 6280-6292.

3. Varbanets LD, Borzova NV. Ispolzovanie metodov himicheskoy modifikatsii dlya stabilizatsii gribnyih glikozidaz // «Biotekhnologiya». – 2011. – Т. 4. – № 6. p. 36-41.

4. Kapreliants LV, Petros’yants AP. **Fermentativniy gidroliz galaktoolisakhari-dov** // Biotekhnologiya – sostoyanie i perspektivy razvitiya: materialy Pervogo Mezhdunarodnogo kongresa, Moskva, 14-18 oct. 2002 г. – М., 2002. – С. 380-381.

5. Underkofler LA, Wulf ML. Isolation and characterization of alpha-galactosidase from *Pichia guilliermondii* // Society for Industrial Microbiology. – 2000. – Vol.21, Ch.35.– P.339-348.

6. Korneeva OS, Zherebtsov NA, Cheremushkina I. Identifikatsiya kataliticheskii aktivnyih grupp // Biohimiya. – 2001. – Vyip.3 – p. 412-418.

Стаття надійшла до редакції 02.02.2016 р.

