

ВПЛИВ ІОНІВ МЕТАЛІВ І СПЕЦИФІЧНИХ ХІМІЧНИХ РЕАГЕНТІВ НА АКТИВНІСТЬ α -L-РАМНОЗИДАЗИ *PENICILLIUM TARDUM*

О.В. Гудзенко, Н.В. Борзова, Л.Д. Варбанець

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна
e-mail: ov_gudzenko@bigmir.net

Мета. Вивчення впливу іонів металів, аніонів та специфічних хімічних реагентів на активність α -L-рамнозидази *Penicillium tardum*. **Методи.** α -L-Рамнозидазну активність визначали за швидкістю гідролізу *p*-нітрофеніл- α -L-рамнопіранозиду. В дослідках щодо впливу на активність α -L-рамнозидази використовували іони металів у вигляді сульфатів, лише Ag^+ – у вигляді нітрату, аніони – у вигляді солей калію або натрію, а також наступні специфічні хімічні реагенти: етилендіамінтетраацетат, *o*-фенантролін, дитіотреїтол, *L*-цистеїн, β -меркаптоетанол, *p*-хлормеркурібензоат, *N*-етилmaleїмід, 1-[3-(диметиламіно)пропіл]-3-етилкарбодимід метіодид. Всі речовини досліджували в концентрації 10^{-3} М. **Результати.** Суттєвий вплив на α -L-рамнозидазу *P. tardum* мали іони Ag^+ та Cd^{2+} (в кінцевій концентрації 10^{-3} М), які повністю інгібували активність ензиму, тоді як Ca^{2+} підвищував активність досліджуваної α -L-рамнозидази *P. tardum* на 60%. При вивченні дії різних аніонів встановлено, що сульфат на 73% інгібує активність ферменту, в той час як аніони AsO_3^{-2} та CO_3^{-2} активують α -L-рамнозидазу *P. tardum* на 100 і 75% відповідно. **Висновки.** В каталізі, що здійснюється α -L-рамнозидазою *P. tardum*, не беруть участі групи, які містять атоми металів. Присутність іонів Ag^+ , Cd^{2+} в системі інгібує швидкість ензимної реакції, тоді як іони Ca^{2+} підвищують активність досліджуваної α -L-рамнозидази *P. tardum* на 60%. Оскільки 1-[3-(диметиламіно)пропіл]-3-етилкарбодимід метіодид інгібує активність α -L-рамнозидази на 50-73%, можна припустити, що в молекулі α -L-рамнозидази присутні функціонально активні карбоксильні групи.

Ключові слова: α -L-рамнозидаза, *Penicillium tardum*, іони металів, специфічні хімічні реагенти.

Ензими є високоактивними, нетоксичними біокаталізаторами, які широко розповсюджені в природі, без яких неможливе здійснення багатьох біохімічних процесів. Пізнання ролі ензимів для всього живого на Землі послужило основою для становлення і розвитку технології ензимних препаратів як для теоретичної науки, так і для створення промислового виробництва найбільш широко вживаних ензимних препаратів, яке є одним з перспективних напрямків біотехнології, що інтенсивно розвивається і розширюється. Серед ензимів, що займають одне з провідних місць, слід відмітити глікозидази, зокрема α -L-рамнозидази [КФ 3.2.1.40], які гідролітично відщеплюють термінальні α -1,2-, α -1,4- та α -1,6-зв'язані залишки L-рамнози, що присутні як в синтетичних, так і природних глікозидах, оліго-, полісахаридах, гліколіпідах і різних глікокон'югатах: похідних

флавоноїдів (рутині, неогесперидині, гесперидині, нарингіні, кверцитрині), а також сапонінах; терпенових глікозидах. Ці властивості ензиму можуть бути використані для потреб харчової, фармацевтичної і хімічної промисловостей. В харчовій промисловості α -L-рамнозидази застосовують для покращення якості напоїв (зменшення гіркоти соків, підсилення аромату вин) і у виробництві харчових добавок, в фармацевтичній – для отримання багатьох лікарських засобів, а також їх попередників, в хімічній – для виробництва рамнози.

На сьогодні накопичено чимало відомостей про бактеріальні, грибові та дріжджові культури мікроорганізмів, які здатні синтезувати α -L-рамнозидазу. Однак найактивнішими біосинтетиками цього ензиму є мікроміцети.

Раніше [1] в результаті скринінгу із колекції живих культур відділу фізіології та систематики мікроміцетів ІМВ НАН України нами був відібраний активний штаб *Penicillium tardum*, вивчені його трофічні особливості та підібрані оптимальні умови культивування [2]. З супернатанту культуральної рідини *P. tardum* виділено і очищено препарат α -L-рамнозидази, вивчено його фізико-хімічні властивості [3]. Разом з тим для створення високоефективної технології отримання ензимних препаратів необхідне дослідження оптимальних параметрів α -L-рамнозидазної реакції, а також механізму дії ензиму. У зв'язку з цим метою нашої роботи було вивчення впливу іонів металів та специфічних хімічних реагентів на активність α -L-рамнозидази *P. tardum*.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження був штаб *Penicillium tardum*, депонований в Українській колекції мікроорганізмів за номером ІМВ F-100074.

Для накопичення ензиму в культуральній рідині штаб *P. tardum* ІМВ F-100074 вирощували у рідкому поживному середовищі, оптимізованому нами раніше для синтезу α -L-рамнозидази, (г/л): рамноза – 5,0; дріжджовий автолізат – 2,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; KCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ – 0,015; рН 5,0. Вирощування проводили в глибинних умовах у колбах Ерленмейера (750 мл), які містили 100 мл рідкого середовища, швидкість обертання качалки – 220 об/хв за температури 25 °С протягом 7 діб.

Препарат α -L-рамнозидази виділяли з культуральних фільтратів продуцента шляхом осадження сульфатом амонію (до 90 % насичення) з наступною хроматографією на заряджених і нейтральних TSK-гелях DEAE-Toyopearl 650-s і Toyopearl, HW-60 («Toyo Soda», Японія) відповідно.

Специфічна α -L-рамнозидазна активність препарату складала 27,7 од./мг протеїну (вміст протеїну – 0,1 мг/мл).

Для визначення α -L-рамнозидазної активності до 0,1 мл розчину ензиму додавали 0,2 мл 0,1 М фосфатно-цитратного буферу (ФЦБ) рН 5,2 та 0,1 мл 0,01 М розчину субстрату *n*-нітрофеніл- α -L-рамнопіранозиду («Sigma-Aldrich», США) у ФЦБ. Реакційну суміш інкубували протягом 10 хв за температури 37°С. Реакцію зупиняли додаванням 2 мл 1 М роз-

чину бікарбонату натрію. До контролю додавали ті ж компоненти, але у зворотному порядку. Кількість *n*-нітрофенолу, який було відщеплено у результаті гідролізу, визначали колориметричним методом на спектрофотометрі СФ-26 за поглинанням при 400 нм [4]. За одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, яка гідролізує 1 мкмоль субстрату за 1 хв в умовах досліду.

В дослідах щодо впливу на активність α -L-рамнозидази використовували іони металів у вигляді сульфатів, лише Ag^+ – у вигляді нітрату, аніони – у вигляді солей калію або натрію (у концентрації 10^{-3} М), а також наступні специфічні хімічні реагенти: етилендіамінтетраацетат (ЕДТА), *o*-фенантролін, дитіотреїтол, L-цистеїн, β -меркаптоетанол, *n*-хлормеркурібензоат (*n*-ХМБ), N-етилmaleїмід, 1-[3-(диметиламіно)пропіл]-3-етилкарбодимід метіодид («Sigma-Aldrich», США). Всі речовини досліджували в концентрації 10^{-3} М. Інкубацію ензиму з реагентом проводили протягом 1 год при температурі 20°C. Для визначення α -L-рамнозидазної активності проби відбирали через 15, 30, 45 і 60 хв. Всі дослідження проводили в 0,1 М ФЦБ рН 5,0.

Фотоокиснення проводили при рН 5,0 і температурі 20°C. Як джерело світла була використана лампа накалу (200 Вт) з червоним світлофільтром, яка знаходилась на відстані 15 см від поверхні розчину. Як фотосенсибілізатор використовували 5×10^{-6} М метиленовий синій. Контролем слугували проби, що містили таку ж кількість фотосенсибілізатора в темряві, а також зразки, що освітлювалися тим же самим джерелом світла, але не містили барвника.

Вміст протеїну на всіх етапах дослідження реєстрували на спектрофотометрі СФ-26 за довжини хвилі 280 нм, а його кількість визначали методом Lowry et al. [5].

Усі досліди проводили в 5-7 повтореннях. Результати досліджень статистично обробляли, використовуючи критерій Стьюдента [6]. У роботі вираховували середні значення величин і стандартні похибки ($M \pm m$). Обробку результатів, що подані графічно, здійснювали з використанням програми Microsoft Excel 2007. Значення розглядали як достовірні при $p < 0,05$.

Результати. Оскільки попередніми дослідженнями, як нашими [7, 8], так і закордонними [9, 10], було встановлено, що концентрація 10^{-3} М є найбільш оптимальною і тому загальноприйнятною при виявленні впливу речовин на активність ферментів, вони досліджувались нами в цій концентрації. Вивчення впливу іонів металів показало (рис. 1), що препарат α -L-рамнозидази *P. tardum* є стійким до дії наступних катіонів: NH_4^+ , K^+ , Li^+ , Ni^{2+} , в той час як іони Na^+ , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} інгібували активність ензиму на 23-92 %. Суттєвий вплив проявляли катіони Ag^+ та Cd^{2+} , які повністю інгібували активність α -L-рамнозидази *P. tardum* (рис. 1). В той же час іони Ca^{2+} підвищували активність досліджуваної α -L-рамнозидази *P. tardum* на 60% (рис.1) за кінцевої концентрації 10^{-3} М.

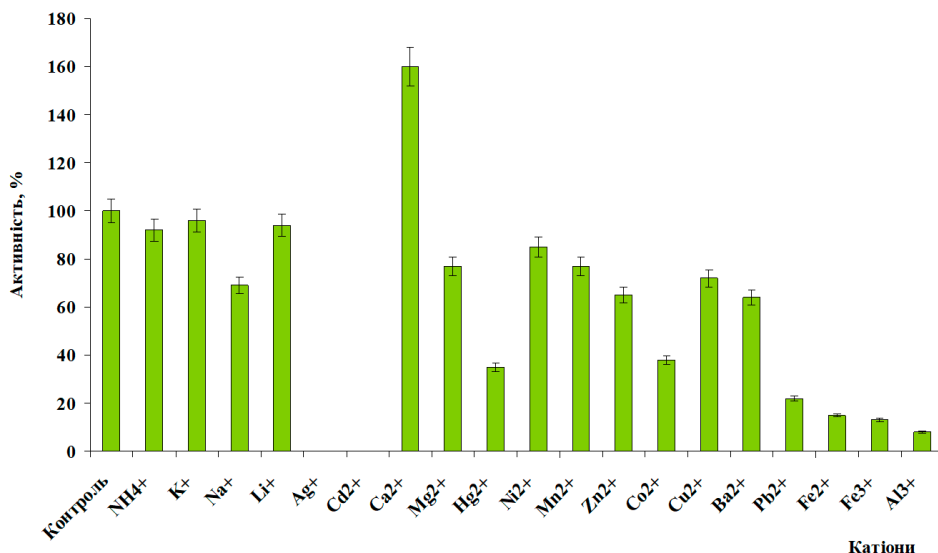


Рис 1. Вплив катіонів металів та амонію на активність α -L-рамнозидази *P. tardum* (Активність наведена у % від контролю)

При вивченні дії різних аніонів на активність α -L-рамнозидази *P. tardum* встановлено (рис. 2), що більшість з них не спричиняє суттєвого впливу на швидкість гідролізу синтетичного субстрату. Лише сульфід на 73% інгібує її активність. Спостерігалась також незначна активуюча дія на α -L-рамнозидазу іонів Cl^- (на 16%); I^- , Br^- (на 20%), H_2PO_4^- (на 2%), $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ (на 16%), що, ймовірно, носить неспецифічний характер. Було показано, що найбільший вплив мають аніони AsO_3^{2-} та CO_3^{2-} , які активують α -L-рамнозидазу *P. tardum* (рис. 2) на 100 і 75% відповідно.

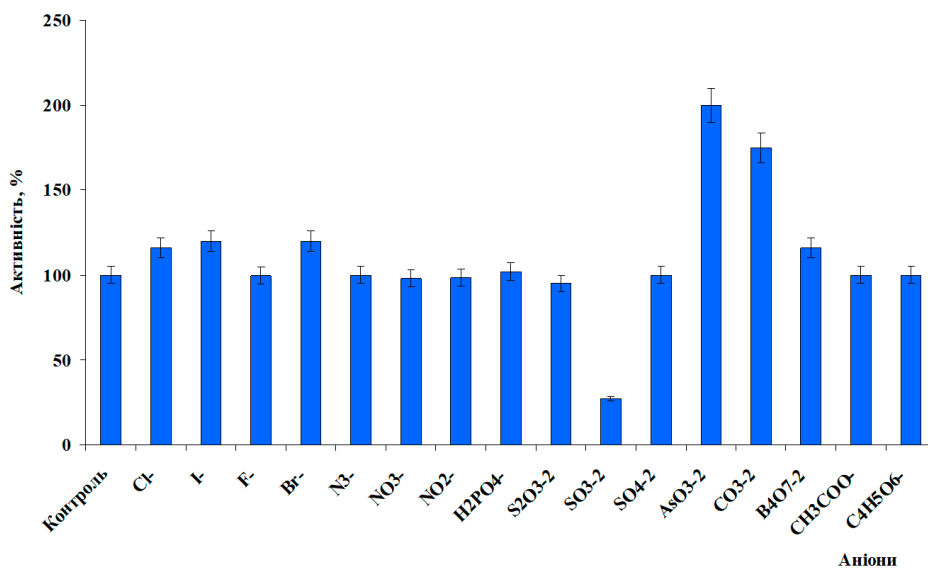


Рис. 2. Вплив різних аніонів на активність α -L-рамнозидази *P. tardum* (Активність наведена у % від контролю)

Одним із підходів щодо вивчення механізму дії ензимів є дослідження впливу специфічних хімічних реагентів на їх активність. Нами були використані (табл. 1):

- 1) хелатуючі реагенти – ЕДТА, *o*-фенантролін;
- 2) реагенти на дисульфідні зв'язки – дитіотреїтол, L-цистеїн, β -меркаптоетанол;
- 3) реагенти на SH-групи – *n*-ХМБ, N-етилмалеїмід;
- 4) реагент на карбоксильні групи – 1-[3-(диметиламіно) пропіл]-3-етилкарбодимід метиодид.

Було встановлено, що хелатуючі агенти (ЕДТА, *o*-фенантролін) в концентрації 10^{-3} М не впливають на активність α -L-рамнозидази *P. tardum* (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив деяких хімічних реагентів на активність α -L-рамнозидази *P. tardum* ($M \pm m$, $n=5$)

Концентрація реагенту, 10^{-3} М	Активність (% від контролю) в залежності від тривалості інкубації				
	0 хв	15 хв	30 хв	45 хв	60 хв
Контроль	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
ЕДТА	100,0	100 \pm 0,1	100 \pm 0,1	100 \pm 0,1	100 \pm 0,1
<i>o</i> -Фенантролін	100,0	105,0	110 \pm 0,2	120 \pm 0,1	120 \pm 0,2
Дитіотреїтол	100 \pm 0,3	120 \pm 0,5	136 \pm 1,7	136 \pm 3,5	136 \pm 4,0
L-Цистеїн	100 \pm 0,7	80 \pm 1,3	70 \pm 0,1	70 \pm 2,2	70 \pm 2,0
β -Меркаптоетанол	100,0	98,2 \pm 1,7	97,5 \pm 3,2	97,7 \pm 1,8	97,7 \pm 1,6
<i>n</i> -Хлормеркурібензоат	100,0	90	83 \pm 0,5	83 \pm 3,2	83 \pm 5,0
N-Етилмалеїмід	100 \pm 0,1	110 \pm 1,0	111 \pm 2,0	111 \pm 0,1	111 \pm 0,9
1-[3-(Диметиламіно) пропіл]-3-етилкарбодимід метиодид	100 \pm 0,1	50 \pm 3,0	33 \pm 2,0	33 \pm 2,0	33 \pm 3,0

Реагенти, що відновлюють дисульфідні зв'язки – дитіотреїтол, L-цистеїн, β -меркаптоетанол, по-різному впливали на активність α -L-рамнозидази *P. tardum*. Дитіотреїтол в залежності від часу інкубації на 20–36% збільшував активність ензиму, тоді як L-цистеїн в даних умовах дослідження проявляв інгібуючу дію на 20–30%. β -Меркаптоетанол ніяк не впливав на активність α -L-рамнозидази *P. tardum* тому, що вона залишалася на рівні контролю.

Відомі тіолові інгібітори, такі як *n*-ХМБ і N-етилмалеїмід, не впливали на активність α -L-рамнозидази в концентрації 10^{-3} М (табл. 1). 1-[3-(диметиламіно) пропіл]-3-етилкарбодимід метиодид, який модифікує карбоксильні групи амінокислот, інгібує активність α -L-рамнозидази на 50–73 %. Ідентифікацію каталітично активних груп ензимів проводили також за кривими залежності активності від значень рН. Для досліджуваної нами α -L-рамнозидази профіль кривої «активність – рН», $v=f(pH)$ має «куполлоподібну» форму (рис. 3). Висхідна («кисла») і низхідна («лужна») гілки кривої свідчать про те, що в елементарному акті розриву глікозидного зв'язку беруть участь дві функціональні групи. Форма обох гілок кривої є характерною для кривих дисоціації іонних груп амінокислот, а гілки кривої описуються рівняннями [17]:

для висхідної гілки

$$V = V_{\max} / (1 + 10^{\text{pK}_b - \text{pH}}) \quad (1)$$

і для низхідної

$$V = V_{\max} / (1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}) \quad (2),$$

де V – активність ензиму за умови повного насичення субстратом; V_{\max} – та ж активність за умови оптимального значення рН ($\text{pH}_{\text{оп}}$); K_a і K_b – константи дисоціації каталітично активних груп ензиму. Звідси випливає, що $\text{pH} = \text{pK}_b$ або при $\text{pH} = \text{pK}_a$ $V = V_{\max} / 2$, тобто за швидкості гідролізу субстрату, що дорівнює половині максимальної, константи іонізації каталітично активної групи ензиму чисельно дорівнюють концентрації H^+ в середовищі. Виходячи з викладеного вище, були розраховані величини pK_b і pK_a (4,1 і 6,0 відповідно) груп, що беруть участь в акті каталізу, який здійснюється α -L-рамнозидазою (рис. 3), які відповідають карбоксильній і імідазольній групам протеїнів.

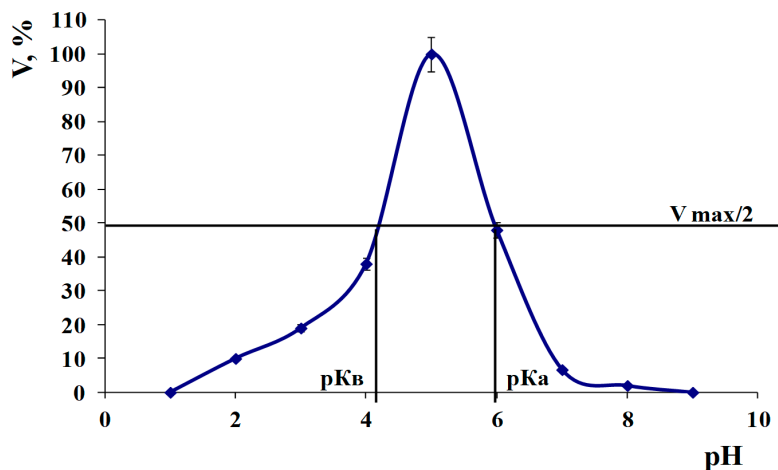


Рис 3. Вплив рН на активність α -L-рамнозидази *P. tardum*

Початкова швидкість реакції – V ; константа іонізації активної групи каталітичного центру ензиму для висхідної гілки кривої – pK_b ; константа іонізації активної групи каталітичного центру ензиму для низхідної гілки кривої – pK_a

Специфічною реакцією на імідазольну групу гістидину є її фотоокиснення в присутності метиленового синього, що відіграє роль фотосенсибілізатора. Фотоокиснення спричиняє розрив гетероциклу імідазолу і інактивує ензим. Було показано, що в умовах дослідження препарат не піддається фотоінактивувачі (рис. 4).

Таким чином, знайдені нами величини pK та результати дослідів щодо фотоокиснення дають підстави вважати, що каталітично активною групою α -L-рамнозидази *P. tardum* є карбоксильна група аспарагінової, глутамінової або іншої С-кінцевої амінокислоти. В каталізі, що здійснюється α -L-рамнозидазою *P. tardum*, не беруть участі групи, які містять атоми металів, але присутність іонів Ag^+ , Cd^{2+} в системі інгібує швидкість ензимної реакції.

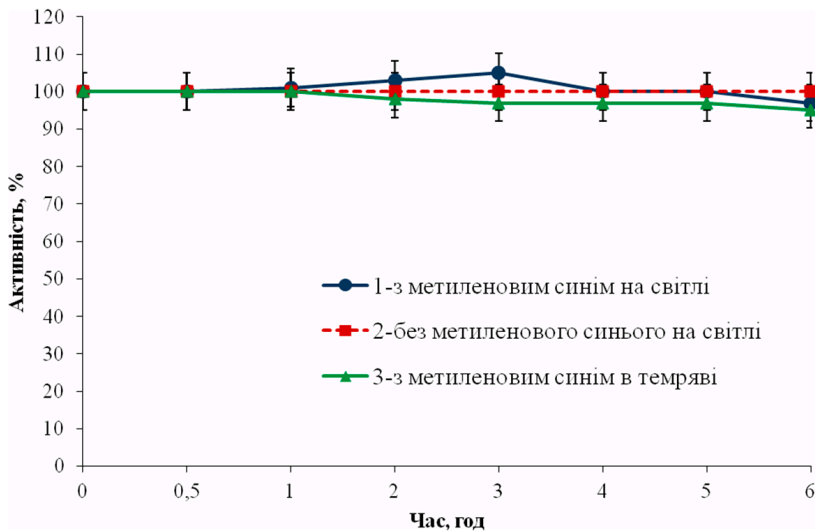


Рис.4. Кінетика інактивації α -L-рамнозидази *P. tardum* в процесі фотоокиснення, рН 5,0

Встановлення каталітично важливих груп активного центру ензиму дозволяє прогнозувати його поведінку в реакційних середовищах та керувати каталізом в умовах оптимізації ензиматичних процесів у біотехнології.

Обговорення. Важливим підходом до вивчення механізму дії ензимів є дослідження функціональних груп активного центру, які безпосередньо беруть участь у каталізі. Для цього використовується інгібіторний аналіз каталітичної реакції за допомогою різних специфічних хімічних реагентів, а також іонів металів та аніонів як потенційних ефекторів ензимів.

Значна кількість ензимів для своєї дії потребує наявності металів. У таких ензимах метали беруть участь в окисно-відновних процесах або відповідають за утворення зв'язку між ензимом і субстратом. Іноді важко з'ясувати, чи даний метал або його іон входить до складу ензиму, чи виконує тільки роль активатора ензиму. В останньому випадку ензим може каталізувати реакцію і без металу. Ензими, що містять у своєму складі метали, без їх присутності не будуть проявляти хімічної активності. Зараз встановлено, що більш, ніж 30 % всіх відомих ензимів є металовмісними або металозалежними. Металоензими зустрічаються в різних класах ензимів. Іон металу може входити в активний центр ензиму або бути зв'язаним із залишками амінокислот апоензиму, що розміщені на певній відстані від активного центру. Крім участі в окисно-відновних процесах метали сприяють формуванню вищих структур апоензиму, які також є необхідними для його функціонування. Ці структури стабілізуються шляхом утворення сольових містків між іонами металів і карбоксильними групами амінокислот.

α -L-Рамнозидаза відноситься до групи ензимів, для яких присутність металу не є обов'язковою умовою прояву активності. Проте вони можуть змінювати конформацію молекули і робити більш доступними для суб-

страту активні центри. При цьому може змінюватися також орієнтація груп, які знаходяться на відстані від активного центру. Передбачити дію того чи іншого металу на активність ензиму практично неможливо.

Суттєвий інгібуючий вплив на α -L-рамнозидазу *P. tardum* проявляють катіони Ag^+ та Cd^{2+} , в меншій мірі – йони Na^+ , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} . Нами також показана [7] інгібуюча дія ртуті на активність α -L-рамнозидази *Eupenicillium erubescens*. З літературних даних відомо [8, 9], що Hg^+ інгібує активність α -L-рамнозидаз *Aspergillus terreus*, *A. flavus*, *A. brasiliensis*, *P. ulaiense*. Іншими дослідниками була показана інгібуюча дія Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} і Mn^{2+} на активність α -L-рамнозидаз *A. nidulans* [10], *A. aculeatus* [11], *A. niger* [12].

Активуючу дію іонів Ca^{2+} на активність α -L-рамнозидаз *A. niger* і *Stagonospora avenae*, а також іонів Zn^{2+} , Mg^{2+} і Co^{2+} на активність α -L-рамнозидази *A. terreus* було показано рядом авторів [13, 14]. Ми теж встановили, що іони Ca^{2+} на 60% підвищували активність досліджуваної α -L-рамнозидази *P. tardum*. Для α -L-рамнозидази *E. erubescens* нами раніше показано [7], що іони Ca^{2+} підвищують активність лише на 5%.

Крім того, дослідники [15] при вивченні кристалічної структури α -L-рамнозидази *Bacillus* sp. GL1 встановили присутність іонів Ca^{2+} з невстановленою функцією.

Механізм інгібуючої дії іонів металів на каталітичну активність встановити досить важко, оскільки їм властива здатність конкурувати з субстратом за місце зв'язування в активному центрі, а також можливість взаємодіяти з різними групами білкової молекули, що знаходяться поза активним центром, але можуть впливати на каталітичні функції ензиму, тобто зв'язуються з його алостеричним центром [10]. Відомо [2], що інгібування активності ензиму іонами важких металів може бути результатом утворення ними комплексів, в першу чергу з сульфгідрильними, а також з карбоксильними або імідазольними групами протеїну. Для того, щоб визначити, які саме групи в молекулі ензиму підлягають впливу важких металів і наскільки вони відповідальні за каталіз, необхідно провести кількісний аналіз.

Дослідження впливу специфічних хімічних реагентів є зручним та інформативним методом оцінки функціональних властивостей ензиму. Оскільки встановлено, що хелатуючі агенти (ЕДТА, *o*-фенантролін) в концентрації 10^{-3} М не впливають на активність α -L-рамнозидази *P. tardum*, це може свідчити про те, що в каталізі, який здійснюється даним ензимом, не беруть участі функціональні групи, що містять атоми металів. На основі цих даних, а також даних щодо впливу іонів металів можна припустити, що α -L-рамнозидаза *P. tardum* є металонезалежним ензимом. Відомо, що більшість глікозидаз [8] є металонезалежними, але відомі приклади і металозалежних – α -L-рамнозидаза *P. ulaiense* [9].

Відомі тіолові інгібітори, такі як *n*-хлормеркурібензоат і *N*-етилmaleїмід, не впливали на активність досліджуваного ензиму. Це дає підстави вважати, що в каталізі, який здійснюється α -L-рамнозидазою *P. tardum*, не беруть участі сульфгідрильні групи.

Оскільки 1-[3-(диметиламіно) пропіл]-3-етилкарбодимід метіодид, який модифікує карбоксильні групи амінокислот, інгібує активність α -L-рамнозидази *P. tardum* на 50–73 %, можна припустити, що в молекулі α -L-рамнозидази присутні функціонально активні карбоксильні групи.

Одним із підходів при вивченні каталітично активних груп ензимів є їх ідентифікація за кривими залежності активності від значень рН. Нами розраховано величини pK_b і pK_a (4,1 і 6,0 відповідно) груп, що беруть участь в акті каталізу, який здійснюється α -L-рамнозидазою. Ці значення відповідають карбоксильній і імідазольній групам протеїнів. Розраховані за цим методом величини pK_b і pK_a близькі до значень pK , знайденим за методом Діксона і Уеба [17]. Це дає підстави припустити, що іонізуються лише каталітично активні групи – карбоксильна та імідазольна.

Специфічною реакцією на імідазольну групу гістидину є її фотоокиснення за присутності метиленового синього, що відіграє роль фотосенсибілізатора. Фотоокиснення приводить до розриву гетероциклу імідазолу і до інактивації ензиму. Було показано, що в умовах дослідження препарат не піддається фотоінактивації. Отже, ймовірно, даний ензим не містить імідазольну групу гістидину у своїй структурі.

Конкретних фактів щодо дії α -L-рамнозидаз дуже мало, оскільки відсутні дані щодо хімії та кінетики ензимів із більшості досліджених продуцентів. За аналогією з іншими глікозидазами припускаємо, що має місце розщеплення зв'язків між С-атомом рамнози і киснем субстратів. Так, встановлено, що розрив зв'язку проходить з того напрямку атому кисню, до якого прилягає нередукуючий залишок оліго- і полісахариду і до якого глікозидаза виявляє найбільшу специфічність. Відомо, що α -L-рамнозидаза у субстратах діє на C_1-O або $O-C_n$ (для α -L-рамнозидаз $n=2, 4, 6$) [8].

Таким чином, знайдені нами величини pK та результати дослідів щодо фотоокиснення дають підстави вважати, що каталітично активною групою α -L-рамнозидази *P. tardum* є карбоксильна група аспарагінової, глутамінової або іншої С-кінцевої амінокислоти. В каталізі, що здійснюється α -L-рамнозидазою *P. tardum*, не беруть участі групи, які містять атоми металів, але присутні іони Ag^+ , Cd^{2+} в системі інгібують швидкість ензимної реакції, а іони Ca^{2+} на 60% підвищують активність досліджуваної α -L-рамнозидази *P. tardum*. Встановлення каталітично важливих груп активного центру ензиму дозволяє прогнозувати його поведінку в реакційних середовищах та керувати каталізом в умовах оптимізації ензиматичних процесів у біотехнології.

Автори висловлюють подяку зав. відділу фізіології і систематики мікроміцетів д.б.н. Курченко І.М. та пров. інженеру Наконечній Л.Т. за люб'язно наданий штам-продуцент P. tardum IMB F-100074.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ И СПЕЦИФИЧЕСКИХ ХИМИЧЕСКИХ РЕАГЕНТОВ НА АКТИВНОСТЬ α -L-РАМНОЗИДАЗЫ *PENICILLIUM TARDUM*

Е.В. Гудзенко, Н.В. Борзова, Л.Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

Резюме

Цель работы. Изучение влияния ионов металлов, анионов и специфических химических реагентов на активность α -L-рамнозидазы *Penicillium tardum*. **Методы.** α -L-Рамнозидазную активность определяли по скорости гидролиза *n*-нитрофенил- α -L-рамнопиранозида. Для изучения влияния на α -L-рамнозидазную активность использовали ионы металлов в виде сульфатов, только Ag^+ – в виде нитрата, анионы – в виде солей калия или натрия, а также следующие специфические химические реагенты: этилендиаминтетраацетат, *o*-фенантролин, дитиотреитол, L-цистеин, β -меркаптоэтанол, *n*-хлормеркурибензоат, N-этилмалеимид, 1-[3-(диметиламино)пропил]-3-этилкарбодимид метиоидид. Все вещества исследовали в концентрации 10^{-3} М. **Результаты.** Существенное влияние на активность α -L-рамнозидазы *P. tardum* имели ионы Ag^+ и Cd^{2+} , которые полностью ингибировали энзим, тогда как Ca^{2+} на 60% повышал активность исследованной α -L-рамнозидазы *P. tardum*. При изучении действия различных анионов установлено, что сульфит на 73% ингибирует активность фермента, в то время как анионы AsO_3^{-2} и CO_3^{-2} активируют α -L-рамнозидазу *P. tardum* на 100 и 75% соответственно. **Выводы.** В катализе, который осуществляется α -L-рамнозидазой *P. tardum*, не принимают участие группы, которые содержат атомы металлов, но присутствие ионов Ag^+ , Cd^{2+} в системе ингибирует скорость энзимной реакции, тогда как ионы Ca^{2+} повышают активность исследуемой α -L-рамнозидазы *P. tardum* на 60%. Поскольку 1-[3-(диметиламино)пропил]-3-этилкарбодимид метиоидид ингибирует активность α -L-рамнозидазы на 50–73 %, можно предположить, что в молекуле α -L-рамнозидазы присутствуют функционально активные карбоксильные группы.

Ключевые слова: α -L-рамнозидаза, *Penicillium tardum*, ионы металлов, специфические химические реагенты.

INFLUENCE OF METAL IONS AND SPECIFIC CHEMICAL REAGENTS ON THE α -L-RHAMNOSIDASE ACTIVITY OF *PENICILLIUM TARDUM*

O.V. Gudzenko, N.V. Borzova, L.D. Varbanets

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

Summary

The aim. Study the influence of metal ions, anions and specific chemical reagents on the activity of α -L-rhamnosidase *Penicillium tardum*. **Methods.** α -L-Ramnosidase activity was determined by the rate of hydrolysis of *n*-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside. To inhibit α -L-rhamnosidase, metal ions were used as sulfates, only Ag^+ as nitrate, anions as potassium or sodium salts, and the following specific chemical reagents:

β -mercaptoethanol, p-chloromercuribenzoate, N-ethylmaleimide, 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide. All substances were investigated in concentration of 10^{-3} M. **Results.** Significant influence on the activity of the *P. tardum* α -L-rhamnosidase was obtained by Ag^+ and Cd^{2+} ions, which completely inhibited the enzyme, whereas Ca^{2+} increased the activity of the studied *P. tardum* α -L-rhamnosidase by 60%. When studying the action of various anions, it was found that sulfite inhibits its activity by 73%. It is also shown that the anions AsO_3^{-2} and CO_3^{-2} , which activate the *P. tardum* α -L-rhamnosidase by 100% and 75%, respectively, have a significant effect. **Conclusions.** In the catalysis, which is carried out by the *P. tardum* α -L-rhamnosidase, the groups containing the metal atoms do not participate, but the presence of Ag^+ and Cd^{2+} ions in the system inhibits the rate of the enzyme reaction. Whereas Ca^{2+} ions increase the activity of the studied α -L-rhamnosidase *P. tardum* by 60%. Since 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide inhibits the activity of α -L-rhamnosidase by 50-73%, it can be assumed that the functionally active carboxyl groups are present in the α -L-rhamnosidase molecule.

Keywords: α -L-rhamnosidase, *Penicillium tardum*, metal ions, specific chemical reagents.

1. Gudzenko O.V., Varbanets LD., Kurchenko IM., Naconechnaya LT. [Screening of the producers α -L-rhamnosidases amongst representatives of *Penicillium*]. Microbiol Z. 2016; 78(2):33-42. Ukrainian.
2. Gudzenko OV, Varbanets LD [Optimization of cultivation conditions of *Penicillium tardum*– α -L-rhamnosidase producer]. Microbiol Z. 2015; 77(4):26-31. Ukrainian.
3. Gudzenko OV, Varbanets LD [Purification and physico-chemical properties of *Penicillium tardum* α -L-rhamnosidase producer]. Microbiol Z. 2016; 78(1):13-22. Ukrainian.
4. Romero C., Manjon A., Bastida J. A method for assaying rhamnosidase activity of naringinase. Analytical Biochemistry. 1985; 149(2):566–571.
5. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R. J. Protein measurement with folinphenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193(2):265-275.
6. Lakyn H. F. Byometrya . Moscow: Vysshaya Shkola; 1990. Russian.
7. Gudzenko O. V., Borzova N.V., Varbanets L.D. [Influence of metal ions and specific chemical reagents on the α -L-rhamnosidase activity of *Eupenicillium erubescens*] Ukrainian Biochemical Journal. 2012; 84(2):30-41.
8. Varbanets L.D., Borzova N.V. [Glycosidases of microorganisms and research methods]. Kyiv: Nauk. Dumka; 2010 . Ukrainian.
9. Manzanares P., Valles S., Ramon D., Orejas M. α -L-rhamnosidase: old and new insights. Industrial Enzymes: Springer; 2007. p. 117-140.
10. Dowzer M., Kelly J.M. Cloning of *creA* gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression. Curr. Genet. 1989; 15(6):457-459.
11. Puri M. Updates on naringinase: structural and biotechnological aspects. Appl. Microb. Biotechnol. 2012; 93(1):49–60.
12. Yadav V., Yadav P. K., Yadav S., Yadav K. D. S. α -L-Rhamnosidase: A review. Process Biochemistry. 2010; 45(8):1226–1235.
13. Yadav V., Yadav K.D.S. New fungal for α -L-rhamnosidase an important enzyme used in the synthesis of drugs and drug precursors. Appl. Biochemistry Microbiol. 2010; 48(3):295–301.

14. Gudzenko O.V., Varbanets L.D. [Microbial α -L-rhamnosidases producers, properties, practical use] *Biotechnologia Acta*. 2012; 5(6):9-26. Ukrainian
15. Hashimoto W., Miyake O., Nanka H.I, Murata K. Molecular identification of an α -L-rhamnosidase from *Bacillus* sp. strain GL1 as an enzyme involved in complete metabolism of gellan. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003; 415(2):235-244.
16. Gudzenko O.V., Varbanets L.D. [Investigation of functional groups α -L-rhamnosidase *Cryptococcus albidus*]. *Microbiol Z.* 2012; 74(4):19-28. Ukrainian.
17. Dixon M., Webb L. [Enzyme, v.1]. Moscow: Mir; 1982. Russian.

Отримано 16.03.2018