



УДК 577.152.311*3.02:577.112.4

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ЛИПАЗЫ НА РЕГУЛЯЦИЮ ЛИПОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В СИСТЕМЕ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ

© 2005 г. И. М. Павленко[#], Н. Л. Клячко, А. В. Левашов

Кафедра химической энзимологии, химический факультет,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119992, Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 23.03.2005 г. Принята к печати 11.04.2005 г.

В результате химической модификации липазы из *Mucor miehei* целлобиозой и *N*-гидроксисукцинимидом пальмитиновой кислоты были получены гидрофилизированный и гидрофобизированный препараты фермента со степенью модификации 4. Проведен сравнительный анализ регуляции каталитической активности нативной и модифицированных липаз в системе обращенных мицелл Аэрозоля ОТ (АОТ) в изооктане. Установлено, что уровень каталитической активности всех препаратов липазы в мицеллярной среде превышает каталитическую активность, проявляемую ими в водном растворе. Химическая модификация липазы не привела к изменению регуляции олигомерного состава фермента, контролируемого степенью гидратации мицелл, w_0 (размером мицелл). На зависимости k_{cat} от w_0 для каждого препарата липазы обнаружены два максимума, соответствующие функционированию мономеров и тетрамеров липаз. Изменение гидрофильно-липофильного баланса поверхности липазы оказало существенное влияние на характер регуляции активности фермента изменением концентрации ПАВ (числа мицелл). Гидрофобизация липазы привела к уменьшению эффекта активации фермента с увеличением концентрации АОТ по сравнению с нативной липазой, а гидрофилизация фермента – к резкому уменьшению активности тетрамера липазы при увеличении концентрации АОТ. Каталитическая активность мономера гидрофилизированной липазы практически не зависит от концентрации АОТ. Кинетические данные свидетельствуют о смешанном типе активации обеих олигомерных форм нативной и гидрофобизированной липаз молекулами АОТ и о бесконкурентном типе активации и ингибирования ими мономера и тетрамера гидрофилизированной липазы соответственно.

Ключевые слова: липаза, химическая модификация, поверхностная активация, олигомерный состав; обращенные мицеллы.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с нерастворимостью в воде природных субстратов липазы, все большее применение в качестве реакционных сред для катализа липазой находят неводные органические системы. Одной из таких систем, уже не раз подтверждающей преимущество своего использования для катализа многими ферментами, является система обращенных мицелл [1–3]. Установлено, что в системе обращенных мицелл ферменты не только сохра-

няют активность, но и в ряде случаев проявляют более высокую активность и стабильность по сравнению с водным раствором и чистой органической средой. Присутствие в системе органической фазы, позволяющей изучать взаимодействие фермента с нерастворимыми в воде соединениями, а также наличие достаточно большой поверхности раздела фаз, необходимой для катализа липазой, делает систему обращенных мицелл уникальной для работы с липолитическими ферментами [4, 5]. Важной особенностью применения системы обращенных мицелл является возможность регуляции каталитической активности ферментов и их олигомерного состава при варьировании соотношения концентрации компонентов системы (изменении размера и концентрации мицелл) [6, 7]. В некоторых случаях для функционирования в системе обращенных мицелл липазе вовсе не требуются такие активаторы, как ионы Na^+ и Ca^{2+} [8, 9], необходимые для липазного катализа в водных эмульсиях.

Сокращения: MmL – нативная форма липазы из *Mucor miehei*; СВ-MmL – MmL, гидрофилизированная остатками целлобиозы; C_{16} -MmL – MmL, гидрофобизированная остатками пальмитиновой кислоты; АОТ – Аэрозоль ОТ, натриевая соль бис(2-этил)гексилевого эфира сульфогрантовой кислоты; ПАВ – поверхностно-активное вещество; HSP – *N*-гидроксисукцинимид пальмитиновой кислоты; NPP – *n*-нитрофенилпальмитат; NP – *n*-нитрофенол; TDC – тауродезоксихолат натрия; TNBS – тринитробензолсульфокислота.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 939-34-29; факс: (095) 939-54-17; эл. почта: ivanka-p@yandex.ru).

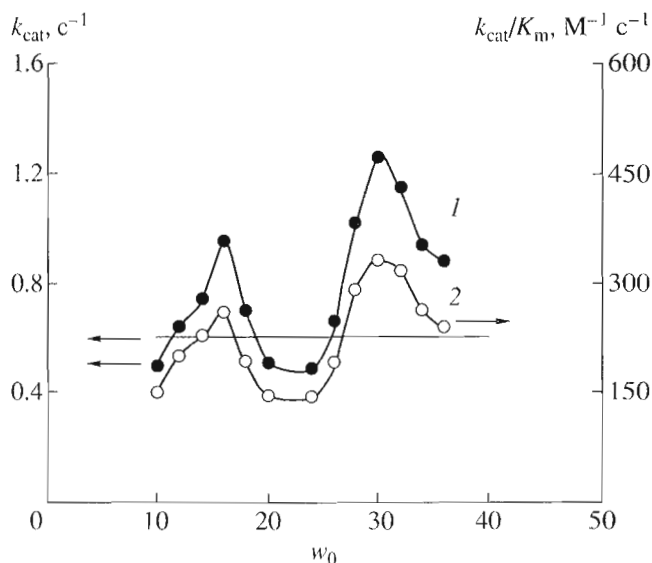


Рис. 1. Зависимость величин k_{cat} (1) и k_{cat}/K_m (2) реакции гидролиза NPP, катализируемого MmL, от степени гидратации обращенных мицелл (50 мМ АОТ/изооктан). Прямая линия – величина k_{cat} той же реакции в водном растворе (50 мМ Трис, рН 7.5).

Однако, учитывая особенность катализа липазой на границе раздела фаз масло/вода, обусловленную формированием активной конформации фермента в результате его адсорбции на поверхности жировой глобулы [10–13], можно предположить возможность взаимодействия липазы с внутренней поверхностью мицеллы, образованной амфифильными молекулами АОТ. Существование подобного контакта липазы с мицеллярной матрицей может быть установлено наличием зависимости активности фермента от концентрации ПАВ в системе обращенных мицелл. Реализация адсорбции липазы на внутренней поверхности мицеллы будет зависеть от многих факторов, и в первую очередь, от свойств самих поверхностей белка и мицеллы (заряд, гидрофобность и т. д.). Таким образом, изменение гидрофильно-липофильного баланса поверхности фермента может приводить к ослаблению или усилению контакта фермента с поверхностью раздела фаз в мицеллярной системе, оказывая тем самым влияние на активность липазы.

В настоящей работе проведено сравнительное изучение поведения гидрофилизованного и гидрофобизованного препаратов липазы с нативным ферментом в системе обращенных мицелл АОТ в изооктане на примере липазы из *Mucor miehei* (КФ 3.1.1.3), широко используемой в пищевой промышленности, особенно в синтезе триглицеридов, имеющих высокую пищевую ценность [14–17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зависимость каталитической активности липазы от степени гидратации обращенных мицелл

Известно, что каталитическая активность многих ферментов зависит от степени гидратации молекул ПАВ ($w_0 = [H_2O]/[ПАВ]$), характеризующей размер внутренней полости мицеллы. Оптимальная каталитическая активность ферментов, солюбилизованных в мицеллы, наблюдается в условиях геометрического соответствия размеров белка и мицеллярной матрицы [18, 19]. По-видимому, условия тесного контакта фермента с мицеллярной оболочкой позволяют поддерживать каталитически активную конформацию фермента.

Зависимость каталитической активности липазы из *M. miehei* (MmL) от степени гидратации АОТ имеет вид кривой с двумя четко выраженными максимумами при значениях w_0 , равных 16 и 30 (рис. 1). Подобные зависимости, имеющие несколько оптимумов, наблюдаются для ферментов, способных функционировать в виде ассоциатов разного олигомерного состава. При этом оптимумы на кривой зависимости активности от степени гидратации ПАВ соответствуют функционированию разных форм белка, в том числе и его отдельных субъединиц.

Сопоставляя значения главных полуосей молекулы MmL ($19 \times 12.5 \times 24.9 \text{ \AA}$, [20]) с радиусом внутренней полости мицеллы при w_0 16, рассчитанным по формуле $r_m = 1.5w_0 + 4$ [21] и равным 28 \AA , можно предположить функционирование липазы в форме мономера в условиях первого оптимума. Наличие второго оптимума каталитической активности фермента при w_0 30 свидетельствует о способности липазы образовывать высокомолекулярный агрегат с более высокой каталитической активностью, чем у мономера.

Методом седиментационного анализа было установлено существование трех олигомерных форм липазы с молекулярными массами 33.2 ± 2.5 , 68.8 ± 2.5 и 134.7 ± 2.4 кДа, функционирующих в диапазонах степени гидратации w_0 10–25, 25–35 и 30–40 соответственно. Полученные нами данные подтверждают существование активного мономера (33.2 кДа) и тетрамера (134.7 кДа) MmL в условиях первого и второго оптимумов на зависимости активности фермента от степени гидратации мицелл. Формирование димерной формы липазы (68.8 кДа) не отражается в виде отдельного пика активности на зависимости k_{cat} от w_0 и, по-видимому, является промежуточной стадией образования более активного тетрамера.

Важно отметить тот факт, что в системе обращенных мицелл величина каталитической активности мономерной и тетрамерной форм MmL превышает уровень активности липазы в водном растворе (рис. 1).

Значение константы Михаэлиса в системе обращенных мицелл на порядок выше наблюдаемой константы в водном растворе. Возможно, этот результат связан с концентрированием нерастворимого в воде субстрата в органической фазе и, как следствие, уменьшением его концентрации вблизи фермента, локализованного во внутренней полости мицеллы.

В системе обращенных мицелл константа Михаэлиса практически не зависит от степени гидратации АОТ. В связи с этим, значение константы эффективности (k_{cat}/K_m) также максимально при ранее установленных оптимальных значениях степени гидратации (рис. 1).

Активация липазы путем увеличения концентрации АОТ в системе обращенных мицелл

Ферменты, функционирующие в системе обращенных мицелл, можно разделить на две группы: способные и неспособные взаимодействовать с мицеллярной матрицей. Тестом на эту способность является зависимость каталитической активности ферментов от концентрации ПАВ в мицеллярной системе при постоянном значении w_0 .

Активность MmL в системе обращенных мицелл сильно зависит от концентрации АОТ, свидетельствуя о взаимодействии липазы с внутренней поверхностью мицеллы. Так, увеличение концентрации молекул АОТ при фиксированном значении w_0 приводит к росту каталитической активности обеих олигомерных форм фермента (рис. 2).

Несмотря на ухудшение константы Михаэлиса с увеличением концентрации АОТ, наблюдается значительное увеличение константы эффективности (k_{cat}/K_m), характеризующее активацию мономерной и тетрамерной форм фермента в условиях низкой концентрации субстрата (таблица).

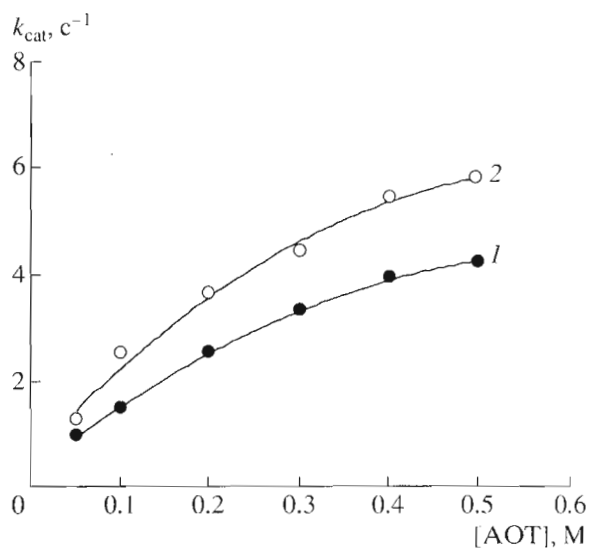


Рис. 2. Зависимость величины k_{cat} реакции гидролиза NPP от концентрации АОТ в системе обращенных мицелл для мономера (1) и тетрамера MmL (2).

Анализ полных кинетических кривых реакции гидролиза NPP, катализируемой липазой, свидетельствует о необратимом ингибировании фермента продуктом реакции (пальмитиновой кислотой), что также характерно для липолиза в водном растворе. Использование системы обращенных мицелл с более высокой концентрацией АОТ частично “снимает” эффект ингибирования, о чем свидетельствует увеличение выхода регистрируемого продукта реакции, *n*-нитрофенола (рис. 3).

Увеличение концентрации АОТ в системе обращенных мицелл при фиксированном значении степени гидратации приводит к увеличению числа идентичных по размеру мицелл и, как следствие этого, к увеличению поверхности раздела фаз. Таким образом, увеличение активности липазы с увеличением концентрации АОТ в системе

Значения константы Михаэлиса и константы эффективности катализа липазами в системе обращенных мицелл при разной концентрации АОТ

АОТ, мМ	K_m , мМ/(k_{cat}/K_m), $M^{-1} c^{-1}$					
	Мономер			Тетрамер		
	MmL	C ₁₆ -MmL	CB-MmL	MmL	C ₁₆ -MmL	CB-MmL
20	—	—	—	—	—	9.4/309
30	—	—	1.96/847	—	—	8.6/304
50	3.7/260	2.7/763	2.0/845	3.8/332	5.7/456	8.0/301
100	4.4/340	3.3/890	2.1/835	5.4/463	6.3/508	6.1/294
300	6.6/500	4.3/1065	2.3/833	8.0/550	8.5/632	4.6/286
500	7.6/553	5.1/1128	2.6/831	9.9/586	9.8/670	3.4/272

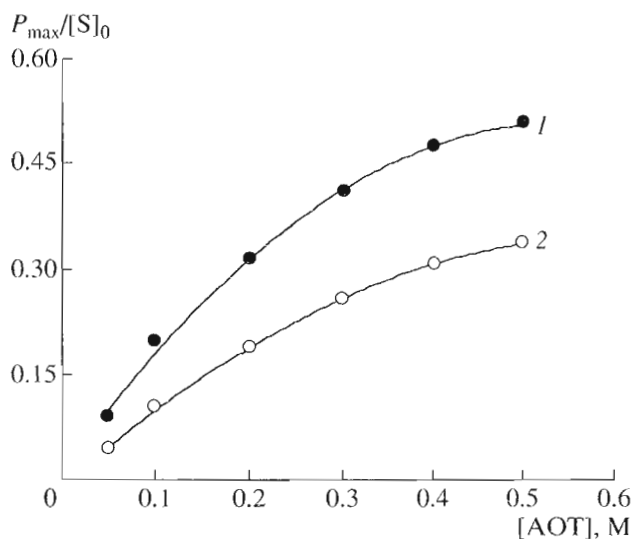


Рис. 3. Зависимость выхода продукта реакции (*p*-нитрофенола) от концентрации АОТ в системе обращенных мицелл при функционировании мономеров MmL (1) и C_{16} -MmL (2).

обращенных мицелл может быть вызвано активацией фермента на границе раздела фаз. Полученные результаты хорошо согласуются со свойством поверхностной активации многих липаз в присутствии агрегатов молекул субстрата, так называемых жировых глобул [10, 11]. Способность липаз к активации объясняется особенной структурой фермента, отличающей липазу от обычных эстераз, катализирующих гидролиз растворимых в воде субстратов. В водном растворе липаза находится в конформации, при которой активный центр фермента закрыт амфифильной петлей и недоступен субстрату. В результате адсорбции фермента на поверхности жировой глобулы происходит изменение положения петли, активный центр фермента открывается, и липаза переходит в активную конформацию [12, 13]. По-видимому, наличие большой поверхности раздела фаз мицеллярной системы заменяет гидрофобную поверхность жировой глобулы, взаимодействие с которой приводит к конформационному изменению структуры белка и формированию открытой для субстрата активной формы фермента.

Увеличение значения константы Михаэлиса с ростом концентрации АОТ в системе можно объяснить тем, что наряду с концентрированием гидрофобного субстрата в органической фазе происходит его частичное встраивание в гидрофобную часть мицеллы, уменьшающее тем самым его доступность ферменту. С ростом концентрации ПАВ при постоянном значении w_0 увеличивается число мицелл в органической фазе и, следовательно, растет концентрация связанного с мицеллой субстрата. Увеличение числа мицелл в системе также может способствовать отводу продукта

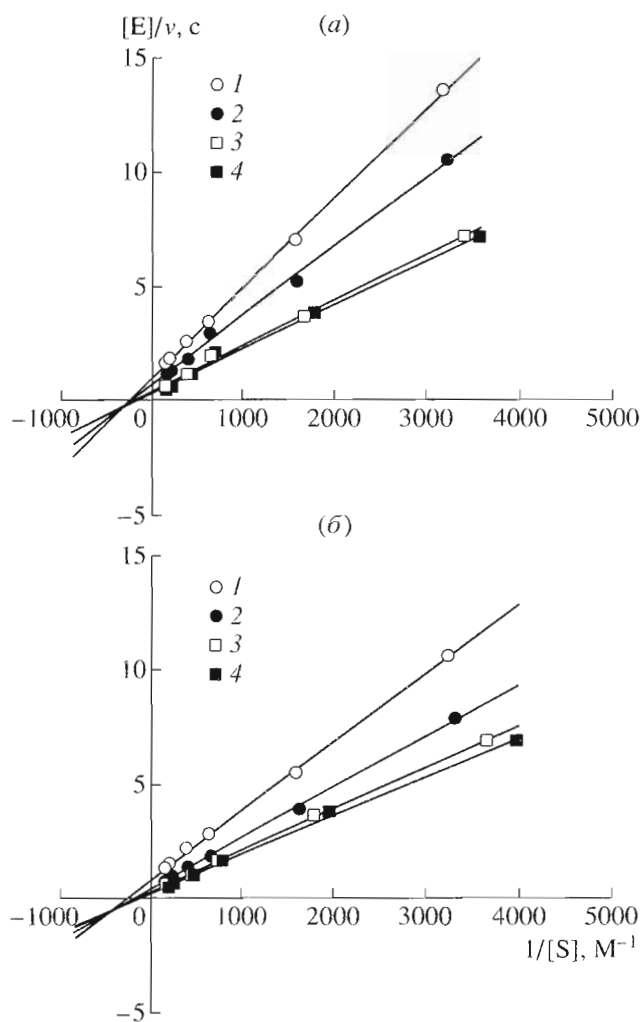


Рис. 4. Зависимость начальной скорости реакции гидролиза NPP от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка для мономера (а) и тетрамера MmL (б). Концентрация АОТ: 50 (1), 100 (2), 300 (3) и 500 мМ (4).

реакции (жирной кислоты) от фермента, чем, по-видимому, обусловлено уменьшение эффекта ингибирования липазы жирной кислотой.

Анализ кинетических данных в координатах Лайнуивера-Берка ($1/v$ от $1/[S]$) свидетельствует о смешанном типе активации мономера и тетрамера MmL молекулами АОТ: k_{cat} , K_m и k_{cat}/K_m увеличиваются при увеличении концентрации АОТ (рис. 4). Согласно данному типу активации, взаимодействие липазы с мицеллярной поверхностью возможно как для свободного фермента, так и для фермент-субстратного комплекса.

Влияние химической модификации на регуляцию ферментативной активности в мицеллах

В результате химической модификации MmL целлобиозой и *N*-гидроксисукцинимидом пальмити-

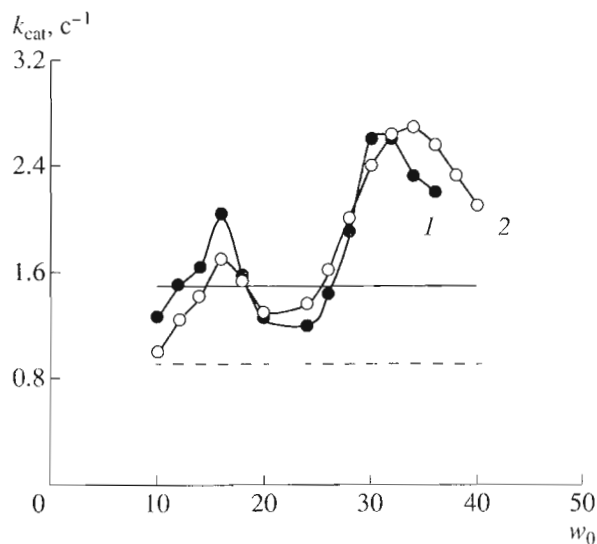


Рис. 5. Зависимость величины k_{cat} реакции гидролиза NPP, катализируемой C_{16} -MmL (1) и СВ-MmL (2), от степени гидратации обращенных мицелл (50 мМ АОТ/изооктан). Сплошная и штриховая прямые – k_{cat} в водном растворе (50 мМ Трис, рН 7.5) для C_{16} -MmL и СВ-MmL соответственно.

новой кислоты были получены гидрофилизованная (СВ-MmL) и гидрофобизованная (C_{16} -MmL) формы липазы со степенью модификации 4 (4 функциональных группы модификатора на одну молекулу фермента). Полученные данные хорошо согласуются со структурными данными молекулы MmL, на поверхности которой находятся семь остатков Lys (Lys50, Lys53, Lys73, Lys106, Lys109, Lys131 и Lys137) и четыре из них (Lys50, Lys73, Lys106 и Lys131) характеризуются наибольшей площадью, доступной растворителю [22]. Lys50, Lys73 и Lys131 расположены на одном участке молекулы белка, отдаленном от каталитического центра фермента, а Lys106 – вблизи него.

Установлено, что модифицированные формы липазы также проявляют повышенную каталитическую активность в системе обращенных мицелл по сравнению с водным раствором (рис. 5).

Изменение гидрофильно-липофильного баланса поверхности липазы в результате химической модификации не оказало влияния на регуляцию олигомерного состава фермента в мицеллярной среде. Так, оптимумы активности мономерной и тетрамерной форм C_{16} -MmL, как и для нативного фермента, были обнаружены при значениях w_0 16 и 30 соответственно. Мономер СВ-MmL проявляет наибольшую активность при w_0 16, а ее тетрамерная форма – при w_0 34. Такое смещение положения оптимума активности в сторону большего значения степени гидратации (большого размера мицеллы) может быть вызвано формированием более рыхлого тетрамера СВ-MmL из-за присут-

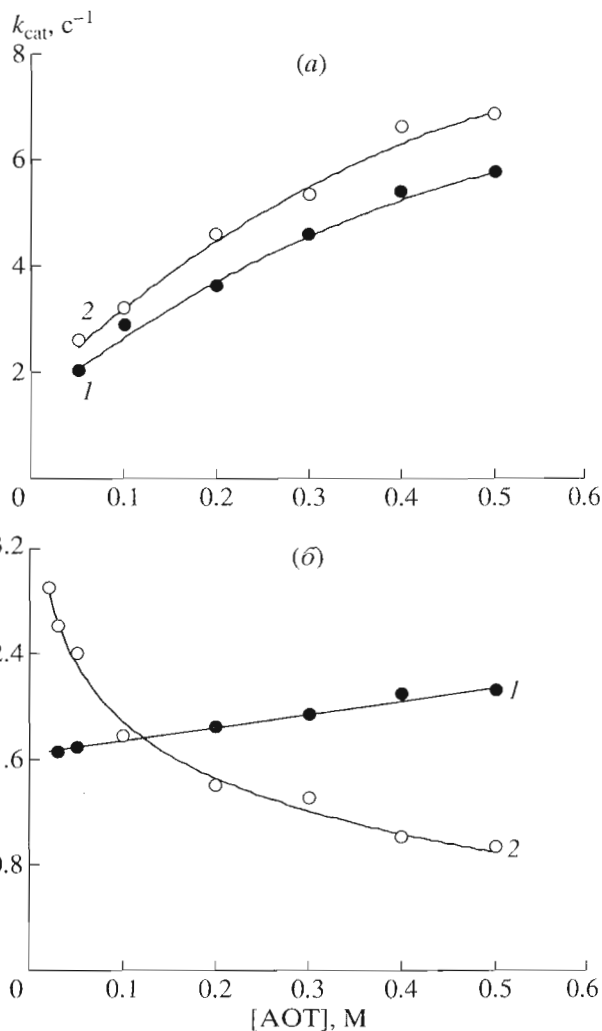


Рис. 6. Зависимость величины k_{cat} реакции гидролиза NPP от концентрации АОТ в системе обращенных мицелл для мономера (1) и тетрамера (2) C_{16} -MmL (а) и СВ-MmL (б).

ствия объемных остатков целлобиозы на поверхности фермента.

Химическая модификация поверхности липазы оказала значительное влияние на характер регуляции активности фермента изменением концентрации АОТ в мицеллярной системе. Гидрофобизация липазы привела к меньшему эффекту активации фермента с ростом концентрации АОТ по сравнению с нативной формой липазы (рис. 6а), а также к меньшему росту выхода продукта реакции (рис. 3). Константа Михаэлиса и константа эффективности C_{16} -MmL также увеличиваются при увеличении концентрации АОТ в системе (таблица). Гидрофилизация липазы вызвала резкое уменьшение активности тетрамерной формы фермента с увеличением концентрации АОТ (рис. 6б). Каталитическая активность мономера СВ-MmL незначительно увеличивается

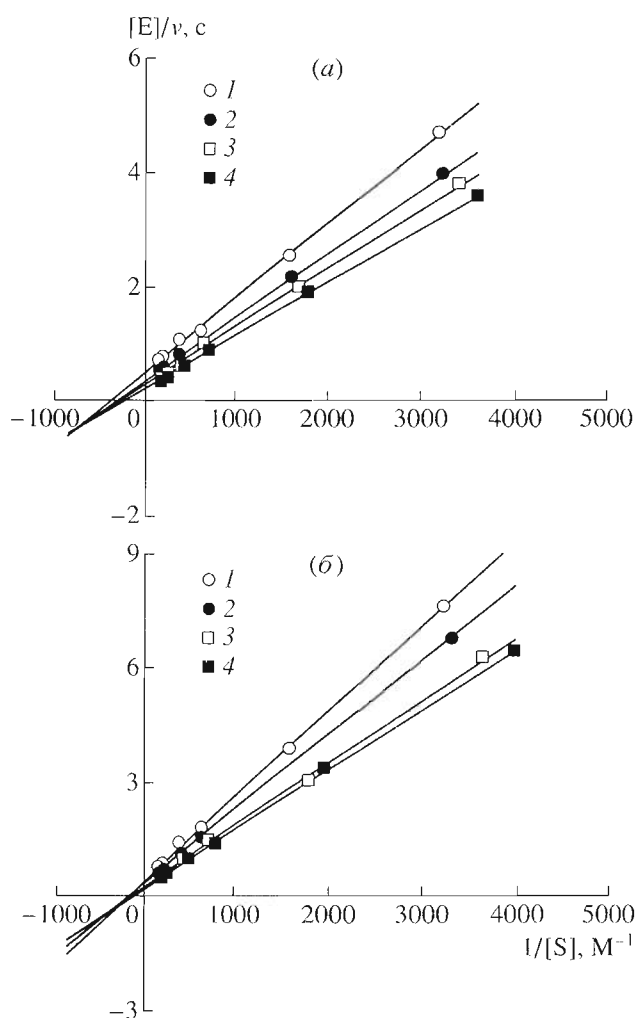


Рис. 7. Зависимость начальной скорости реакции гидролиза NPP от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка для мономера (а) и тетрамера (б) C_{16} -MmL. Концентрация АОТ: 50 (1), 100 (2), 300 (3) и 500 мМ (4).

при увеличении концентрации ПАВ. Однако константа эффективности этой формы липазы практически не зависит от концентрации АОТ (таблица).

Наблюдаемое различие в регуляции активности нативной и модифицированных липаз изменением концентрации ПАВ в мицеллярной системе должно быть обусловлено различной природой взаимодействия фермента с внутренней поверхностью мицеллы. Для C_{16} -MmL возможно усиление контакта фермента с мицеллой за счет дополнительных гидрофобных взаимодействий остатков пальмитиновой кислоты на поверхности белковой глобулы с гидрофобной частью молекул АОТ, способствующих частичной фиксации фермента в мицеллярной матрице. Образование более жесткого комплекса фермента с мицеллой делает липазу менее чувствительной к увеличению поверхности раздела фаз при увеличении

концентрации ПАВ, что объясняет уменьшение эффекта активации липазы после ее гидрофобизации. Меньший эффект активации C_{16} -MmL по сравнению с нативной липазой также может быть обусловлен стабилизацией открытой конформации фермента остатком пальмитиновой кислоты, расположенным вблизи каталитического центра липазы.

Гидрофилизация липазы приводит к формированию сахарной прослойки между ферментом и внутренней поверхностью мицеллы, препятствующей активации липазы на межфазной поверхности. Остатки целлобиозы на поверхности СВ-MmL могут выступать в качестве якорных групп, взаимодействие которых с мицеллярной матрицей будет способствовать отводу каталитического центра фермента с межфазной поверхности и, как следствие, препятствию активации липазы на границе раздела фаз.

Анализ кинетических данных в координатах Лайнуивера-Берка ($1/v$ от $1/[S]$), представленных на рис. 7 и 8, демонстрирует смешанный тип активации обеих олигомерных форм C_{16} -MmL молекулами АОТ (k_{cat} , K_m и k_{cat}/K_m увеличиваются при увеличении концентрации АОТ), бесконкурентный тип активации ими мономера СВ-MmL (k_{cat} и K_m увеличиваются, k_{cat}/K_m не меняется при увеличении концентрации АОТ) и бесконкурентный тип ингибирования ими тетрамера СВ-MmL (k_{cat} и K_m уменьшаются, k_{cat}/K_m практически не меняется при увеличении концентрации АОТ). Таким образом, что MmL и C_{16} -MmL контактируют с мицеллярной поверхностью в форме свободного фермента и фермент-субстратного комплекса, в то время как взаимодействие СВ-MmL с мицеллярной матрицей возможно только в случае образования фермент-субстратного комплекса.

В заключение следует отметить, что важным результатом настоящей работы является обнаружение активации липазы в системе обращенных мицелл, регулируемой концентрацией ПАВ и обусловленной взаимодействием фермента с мицеллярной матрицей. Изменение характера активации фермента в среде обращенных мицелл возможно с помощью химической модификации (гидрофобизации или гидрофилизации) поверхности липазы, приводящей к усилению или ослаблению контакта фермента с внутренней поверхностью мицеллы. Использование данных приемов регуляции катализа липазами может иметь важное значение в биотехнологических целях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали грибную липазу из *M. miehei* (КФ 3.1.1.3, по данным SDS-ПААГ-электрофореза обнаружена одна главная полоса с молекулярной массой в области 33 кДа) с удель-

ной активностью 4000 ед./мг белка, белки-маркеры, *n*-нитрофенилпальмитат (NPP), *n*-нитрофенол (NP), натриевую соль бис(2-этил)гексилевого эфира сульфогантарной кислоты (АОТ), *N*-гидроксисукцинимид пальмитиновой кислоты (HSP), *D*-целлобиозу, тауродезоксихолат натрия (TDC), додецилсульфат натрия (SDS), тринитробензолсульфокислоту (TNBS), лейцин и боргидрид натрия производства "Sigma" (США), трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), борную кислоту, двузамещенный фосфат натрия и гидрокарбонат натрия производства "ICN Biochemicals" (США), хлорид кальция "ос. ч.", β -меркаптоэтанол, *n*-диоксан "ос. ч." и изооктан (для ВЭЖХ) производства "Рехим" (Россия), краситель Coomassie Brilliant Blue R-250 фирмы "Ferack" (Германия).

SDS-ПААГ-электрофорез. Для определения чистоты препарата фермента и его молекулярной массы был проведен SDS-ПААГ-электрофорез с концентрирующим (4%) и разделяющим (12%) гелями с использованием системы Electrophoresis Power Supply фирмы "Bio-Rad" (США). Исследуемые водные растворы ферментов с концентрацией 2 мг/мл предварительно обрабатывали 1% SDS и 5% β -меркаптоэтанолом при 100°C в течение 10 мин. В качестве стандартов использованы следующие белки (*M*, кДа): β -галактозидаза (116), бычий сывороточный альбумин (66), овальбумин (45), глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (36), карбоангидраза (29), гидролизованый бычий трипсиноген (24), соевый ингибитор трипсина (20.1) и α -лактальбумин (14.2). Окраску белка в гелях производили красителем Coomassie Brilliant Blue R-250.

Определение липолитической активности. Для определения активности липазы в мицеллярной системе к 1 мл раствора АОТ в изооктане добавляли 5–200 мкл 16 мМ NPP в том же растворе, а также необходимое количество 50 мМ Трис (рН 7.5) для достижения требуемой степени гидратации. Реакцию инициировали введением 2–10 мкл раствора фермента с концентрацией 2–5 мг/мл в том же буфере. Полученную систему интенсивно встряхивали до получения прозрачного раствора и непрерывно регистрировали кинетику накопления продукта реакции (*n*-нитрофенола) по изменению оптической плотности при 400 нм и температуре 35°C.

Для измерений в водном растворе рабочий раствор субстрата готовили в диоксане и использовали 50 мМ Трис (рН 7.5), содержащий 25 мМ CaCl₂ и 0.1 вес. % TDC.

Фоновый гидролиз субстрата в условиях опыта отсутствовал. Коэффициент молярного поглощения продукта реакции (NP) был установлен экспериментально при разных значениях степени гидратации мицелл. Все кинетические измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1601

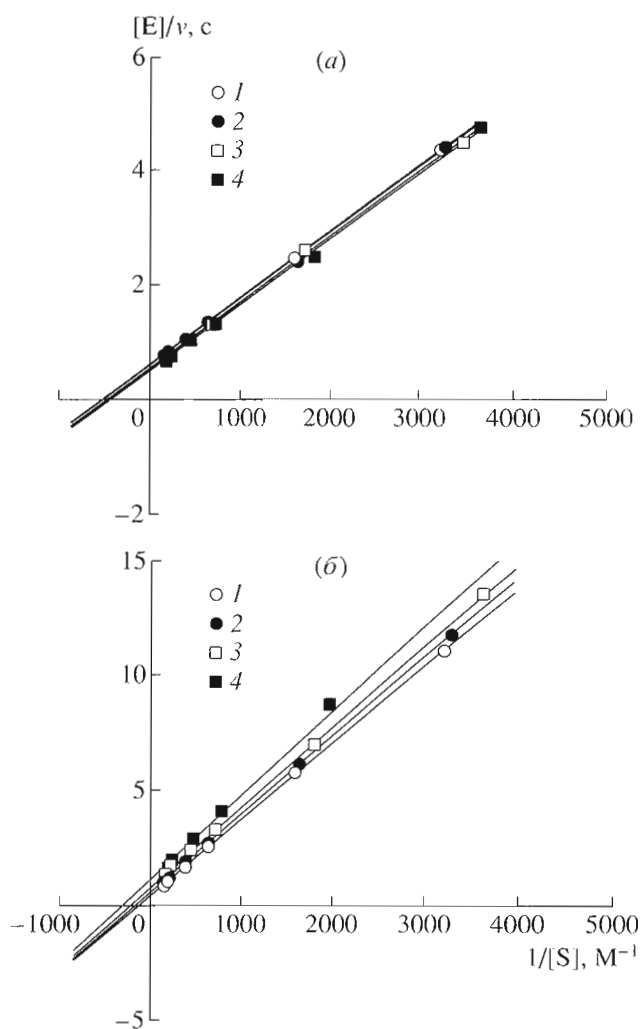


Рис. 8. Зависимость начальной скорости реакции гидролиза NPP от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка для мономера (а) и тетрамера СВ-МмЛ (б). Концентрация АОТ: 50 (1), 100 (2), 300 (3) и 500 мМ (4).

ГРС (Япония), снабженном термостатируемым кюветным отделением.

Значения кинетических констант ферментативной реакции (k_{cat} и K_m) определяли из зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка ($1/v$ от $1/[S]$). Выход продукта ферментативной реакции рассчитывали из полных кинетических кривых.

Седиментационный анализ. Молекулярную массу олигомерных форм фермента в системе образцовых мицелл определяли с помощью седиментационного анализа на аналитической ультрацентрифуге Beckman E (США) при скорости вращения 20000 об/мин и сканировании при 280 нм (20°C). Коэффициенты седиментации и молекулярную

массу олигомерных форм липазы рассчитывали согласно методике [23].

Гидрофилизация липазы. Гидрофилизованная липаза была получена взаимодействием NH_2 -групп лизина на поверхности фермента с *D*-целлобиозой. Для этого к 1 мл 50 мМ боратного буфера (рН 8.0), содержащего 5 мг липазы, добавляли несколькими порциями каждый час по 100 мкл 50 мМ раствора целлобиозы в том же буфере (соотношение молярной концентрации модификатора и фермента составляло 165 : 1). Реакцию модификации проводили в течение 12 ч при постоянном перемешивании и температуре 4°C, после чего к реакционной смеси небольшими порциями добавляли 100 мкл водного раствора NaBH_4 (5 мг/мл).

Гидрофобизация липазы. Гидрофобизованная липаза была получена в результате взаимодействия NH_2 -групп лизина на поверхности фермента с HSP. Для этого 10 мг липазы растворили в 3 мл 0.1 М фосфатного буфера (рН 8.5), содержащего 0.1% TDC. К полученному раствору фермента добавляли несколькими порциями каждый час по 100 мкл раствора HSP в *n*-диоксане (40 мг/мл, соотношение молярной концентрации модификатора и фермента составляло 150 : 1). Реакцию модификации проводили в течение 12 ч при постоянном перемешивании и температуре 4°C.

Очистку модифицированных препаратов фермента после химической модификации проводили с помощью гель-фильтрации на мини-колодке с Sephadex G-25 medium (Pharmacia, США), уравновешенной 50 мМ Трис (рН 7.5). Гидрофобизованный препарат липазы предварительно фильтровали через мембрану Millex-GV с размером пор 0.22 мкм (Millipore, Англия). Очищенные препараты липазы концентрировали с помощью концентратора Minicon B-15 (Amicon, США). Концентрацию модифицированного фермента определяли по поглощению при 280 нм, предварительно установив коэффициент молярного поглощения нативной липазы (ϵ 62000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Определение степени модификации липазы. Число ковалентно модифицированных групп лизина липазы определяли согласно методике [24], основанной на взаимодействии TNBS с немодифицированными группами лизина фермента. Для этого к 1 мл водного раствора липазы (0.33–0.66 мг/мл) в 2% SDS добавляли по 1 мл водных растворов 4% NaHCO_3 и 0.1% TNBS. Реакционную смесь инкубировали в темноте при 40°C в течение 2 ч. После внесения в каждую пробирку по 0.5 мл 10% раствора SDS и 1 М HCl регистрировали оптическое поглощение при 335 нм относительно воды.

Концентрацию аминокрупп фермента, взаимодействующих с TNBS, определяли по калибровочному графику, построенному относительно лейцина (Leu). Степень модификации липазы определяли

по разнице числа групп лизина, взаимодействующих с TNBS, между нативным и модифицированным ферментом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klyachko N.L., Levashov A.V. // Curr. Opin. Colloid. Interface Sci. 2002. V. 8. P. 179–186.
2. Levashov A.V., Klyachko N.L. // Interfacial Catalysis / Ed. Volkov A.G. New York: Marcel Dekker, 2002. P. 355–376.
3. Левашов А.В., Клячко Н.Л. // Изв. АН. Серия хим. 2001. № 10. С. 1638–1651.
4. Stamatis H., Xenakis A., Kolisis F.N. // Biotechnol. Adv. 1999. V. 17. P. 293–318.
5. Carvalho C.M.L., Cabral J.M.S. // Biochimie. 2000. V. 82. P. 1063–1085.
6. Martinek K., Levashov A.V., Klyachko N.L., Khmelnskiy Y.L., Berezin I.V. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 55. P. 453–468.
7. Kabanov A.V., Klyachko N.L., Nametkin S.N., Merker S., Zaroza V., Bunik M., Ivanov V., Levashov A.V. // Protein Eng. 1991. V. 4. P. 1009–1017.
8. Han D., Rhee J.S. // Biotechnol. Lett. 1985. V. 7. P. 651–656.
9. Павленко И.М., Купцова О.С., Клячко Н.Л., Левашов А.В. // Биоорганическая химия. 2002. Т. 28. С. 50–55.
10. Schmid R.D., Verger R. // Angew. Chem. Int. Ed. 1998. V. 37. P. 1608–1633.
11. Verger R. // TIBTECH. 1997. V. 15. P. 32–38.
12. Brzozowski A.M., Derewenda U., Derewenda Z.S., Dodson G.C., Lawson D.M., Turkenburg J.P., Bjorkling F., Huge-Jensen B., Patkar S.A., Thim L. // Nature. 1991. V. 351. P. 491–494.
13. Dodson G.G., Laeson D., Winkler F.K. // Faraday Discuss. 1992. V. 93. P. 95–105.
14. Bloomer S., Adlercreutz P., Mattiasson B. // J. Am. Oil. Chem. Soc. 1990. V. 67. P. 519–524.
15. Macrae A.R. // J. Am. Oil. Chem. Soc. 1983. V. 60. P. 291–294.
16. Akoh C.C. // INFORM. 1995. V. 6. P. 1055–1061.
17. Gudmundsson B.O., Almarsson O., Haraldsson G.G. // Tetrahedron Lett. 1993. V. 34. P. 5791–5794.
18. Martinek K., Klyachko N.L., Kabanov A.V., Khmelnskiy Y.L., Levashov A.V. // Biochim. Biophys. Acta. 1989. V. 981. P. 161–172.
19. Клячко Н.Л., Пищецкий А.В., Кабанов А.В., Вакула С.В., Мартинек К., Левашов А.В. // Биол. мембраны. 1990. Т. 7. С. 467–472.
20. Derewenda Z.S., Derewenda U., Dodson G.G. // J. Mol. Biol. 1992. V. 227. P. 818–839.
21. Eicke H.F., Rehak J. // Helv. Chim. Acta. 1976. V. 59. P. 2883–2891.
22. Brzozowski A.M., Derewenda Z.S., Dodson E.J., Dodson G.G., Turkenburg J.P. // Acta Crystallogr. B. 1992. V. 48. P. 307–317.
23. Levashov A.V., Khmelnskiy Yu.L., Klyachko N.L., Chernyak V.Ya., Martinek K. // J. Colloid Interface Sci. 1982. V. 88. P. 444–457.
24. Fields R. // J. Biochem. 1971. V. 124. P. 581–590.

Effect of Chemical Modification of Lipase on the Regulation of Its Lipolytic Activity in Reversed Micelles

I. M. Pavlenko[#], N. L. Klyachko, and A. V. Levashov

[#] Phone: +7 (095) 939-3429; fax: +7 (095) 939-5417; e-mail: ivanka-p@yandex.ru

Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Moscow State University,
Vorob'evy Gory, Moscow, 119992 Russia

Hydrophilized and hydrophobized forms of the lipase from *Mucor miehei* were obtained by its chemical modification with cellobiose and *N*-succinimidyl palmitate with a modification degree of 4 in both cases. A comparative analysis of the regulation of the catalytic activities of the native and modified lipases was carried out in the system of reversed micelles of OT aerosol (AOT) in isooctane. The level of catalytic activity of all the lipase preparations in the micellar medium was found to be higher than that in aqueous solution. The chemical modification of lipase did not result in a change in the regulation of the oligomeric composition of the enzyme controlled by the degree of micelle hydration ω_0 (micelle size). The k_{cat} dependences on ω_0 for each lipase preparation exhibit two maxima, corresponding to the functioning of lipase monomers and tetramers. The changes in the hydrophilic–lipophilic balance of the lipase surface significantly affect the character of the regulation of enzyme activity due to changes in the surfactant concentration (the number of micelles). The lipase hydrophobization results in a decrease in the enzyme activation effect with an increase in the AOT concentration in comparison with the native lipase. The lipase hydrophilization dramatically decreases the activity of lipase tetramer when the AOT concentration is increased. The catalytic activity of the monomer of hydrophilized lipase is practically independent of the AOT concentration. Kinetic data indicate a mixed type of activation of both oligomeric forms of the native and the hydrophobized lipase by AOT molecules and the noncompetitive type of the activation and AOT inhibition of the monomer and the tetramer of the hydrophilized lipase, respectively. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: lipase, chemical modification, surface activation, oligomeric composition, reversed micelles