

Изследване влиянието на някои алкохоли върху активността и стабилността на ензима β -галактозидаза

Настя Василева, Владислав Йотов, Цонка Годжевъргова

Study of the effect of some alcohols on the activity and stability of β -galactosidase enzyme:

The relative activity and thermal stability of native β -galactosidase were studied at temperatures of 20 °C and 40 °C for 1 h and in the presence of organic solvents (methylol, ethyleneglycol, glycerol) with concentrations from 10% to 60%. At 20 °C in all the organic solvents activating effect on the enzyme was observed. At the higher temperature (40 °C) the glycerol exhibit better stabilizing and activating effect on the native β -galactosidase.

Key words: β -Galactosidase; Organic solvents; Activity, Stability

ВЪВЕДЕНИЕ

Каталитичната активност и стабилност са едни от най-важните характеристики на ензимите. Установено е, че те могат да бъдат подобрени чрез прибавяне на различни компоненти към реакционната среда, като захари, полиоксиетилен, етилцелулоза, многовалентни алкохоли, аминокиселини, хидрофобни органични разтворители и др. [3,6,7,12,19,21]. Последните образуват многочислени водородни връзки с аминокиселинните остатъци на ензима, които предотвратяват спонтанната му или индуцирана чрез нагряване денатурация [1].

Някои автори твърдят, че в присъствие на органични разтворители (моно-, ди- и три- валентни алкохоли) ензимите проявяват повишена термична стабилност и различна субстратна специфичност [5,8,9,11]. Други автори са установили, че подобряване на стабилността на ензима може да се осъществи само при ниски концентрации на органичен разтворител [2,18,23]. При увеличаване на концентрацията на органичния разтворител обаче, се наблюдава инактивиране [17,21], причинено преди всичко от обратими конформационни изменения в протеиновата молекула, т.е. от денатурация.

β -Галактозидазата е важен индустриален ензим, който катализира хидролизата на лактозата в млякото, отпадъчната суроватка и др. до глюкоза и галактоза [4,10,14,16,20,22]. Получените ценни глюкозо-галактозни сиропи се използват в хранително-вкусовата промишленост.

Целта на настоящото изследване е да се проследи влиянието на някои моно-, ди- и три- валентни алкохоли върху активността и стабилността на свободната β -галактозидаза.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали и реагенти

Използвана е β -галактозидаза (ЕК 3.2.1.23) със специфична активност 151 U/mg, изолирана от *Escherichia coli*, производство на Sigma-Aldrich, Швейцария.

Специфичната активност на свободната β -галактозидаза се определя със следните реактиви: 2-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (Sigma-Aldrich, Швейцария); натриев карбонат (ч.з.а., местно производство); фосфатен буфер, лабораторно получен от динатриев хидрогенфосфат и лимонена киселина (ч.з.а., Reahim, Русия).

За изследване стабилността на свободния ензим са използвани метанол, 1,2-етандиол и 1,2,3-пропантриол, местно производство, ч.з.а.

4. Анализи

Количеството белтък в ензимния разтвор се определя по метода на Lowry et al. [15].

Абсолютната активност на свободната β -галактозидаза се определя по метода на Kuby S. A. et al. [13].

5. Определяне на термичната стабилност на свободната β -галактозидаза в присъствие на органични разтворители

Приготвят се водни разтвори на органичните разтворители (метанол, 1,2-етандиол, 1,2,3-пропантриол), като концентрацията им е варирана в интервала от 10 об% до 60 об%. В епруветка се поставят 2,4 cm³ от всеки воден разтвор на органичен разтворител. Към всеки разтвор се прибавят 0,6 cm³ от 0,0045 % разтвор на β -галактозидаза. Получените смеси се инкубират в продължение на 1 час, при температури съответно 20oC и 40 oC. През определен интервал от време се определя активността на β -галактозидазата по метода описан по-горе.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В нашия експеримент са избрани три органични разтворители: моно-, ди- и три-валентни алкохоли - метанол; 1,2-етандиол; 1,2,3-пропантриол. Проследено е влиянието на тези алкохоли върху относителната активност на свободната β -галактозидаза при температури 20 oC и 40 oC. При по-висока от 40 oC температура изследвания не са направени, тъй като се установи, че свободният ензим губи около 45% от своята активност още при 45 oC.

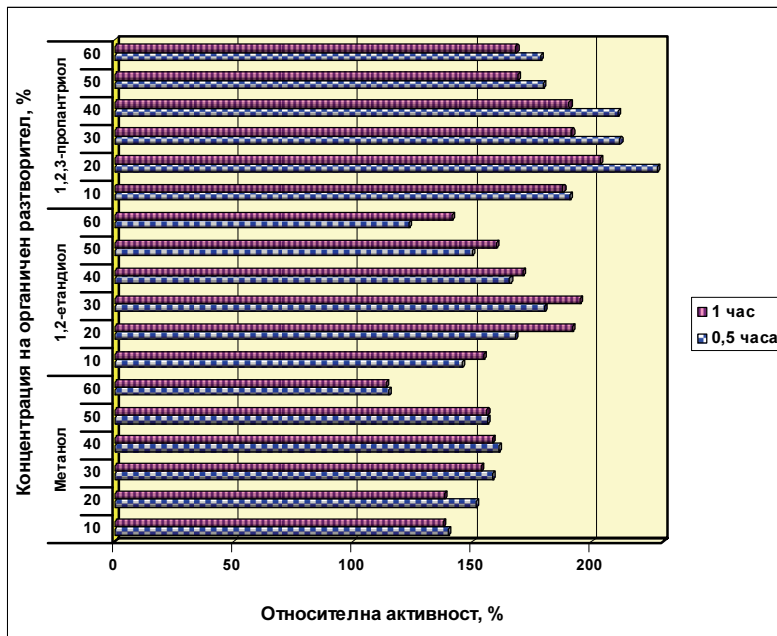
На фиг. 1 е проследено влиянието на органичните разтворители (в концентрационен интервал от 10% до 60%) върху относителната активност на свободната β -галактозидаза при температура 20 oC в продължение на 1 час. Вижда се, че при тази ниска температура, действието на ензима се активира в присъствие на всички органични разтворители и при всички изследвани концентрации. Това активиране е доказателство, че не са настъпили съществени конформационни изменения в молекулата на ензима, в резултат на което неговата активност се повишава. Този факт е констатиран и от други автори [7,12]. Разбира се степента на активиране зависи от вида на разтворителя и количеството на хидроксилните групи в последния. Потвърждават се изследванията на някои автори [1], че с увеличаване на количеството на хидроксилните групи в разтворителя, се осъществяват по-голям брой водородни връзки с аминокиселинните остатъци на ензимната молекула и това води до по-голяма стабилност на ензима. Това особено силно е проявено в присъствие на 1,2,3-пропантриол. С увеличаване на концентрацията на последния относителната активност се увеличава, като при 20% 1,2,3-пропантриол относителната активност на ензима проявява максимална стойност (227,6% на 0,5 час и 203,8% на първия час). С последващо увеличаване на концентрацията на 1,2,3-пропантриол се наблюдава намаляване на относителната активност на ензима, което при 60% концентрация на 1,2,3-пропантриол достига 179% на 0,5 час и 168,4% на първия час.

Същата зависимост се наблюдава и в присъствие на метанол. Разликата е в това, че тук относителната активност на ензима се увеличава в по-малка степен. Увеличаване на относителната активност на β -галактозидазата се наблюдава до 30% концентрация на метанол, след което, при концентрации 40% и 50% метанол, относителната активност започва да намалява. В присъствие на 60% метанол се наблюдава значително намаление на относителната активност на ензима – до 110%.

От фиг. 1 се вижда също така, че по-голямо активиране на ензима, в присъствие на метанол и 1,2,3-пропантриол се наблюдава още на 0,5 часа, след което с течение на времето активността започва да намалява незначително.

Интересно е влиянието на 1,2-етандиола върху относителната активност на β -галактозидазата. От фиг. 1 се вижда, че относителната активност на ензима се увеличава и след 0,5 часа. Такава зависимост не беше установена в присъствие на другите два изследвани разтворителя. Увеличаването на активността на ензима при 1,2-етандиола се обяснява с енергитичната стабилност на единия от конформерите на разтворителя. В хода на реакцията се поглъща енергия и се получава предимно S-цис конформера, който е по-стабилен, поради образуването на вътрешно-

молекулни водородни връзки. Както и при метанола и 1,2,3-пропантриола, относителната активност на ензима се увеличава с увеличаване на концентрацията на 1,2-етандиол, достига максимална стойност (180,5% на 0,5 час и 195,4% на първия час) в присъствие на 30% концентрация и започва постепенно да намалява при по-високите концентрации на този разтворител (в присъствие на 60% 1,2-етандиол ензимът проявява относителна активност 123,5% на 0,5 час и 141,8% на първия час).



Фиг. 1. Влияние на концентрацията на органичните разтворители върху относителната активност на свободната β -галактозидаза. Ензимът е инкубиран в продължение на 1 час при температура 20 оС.

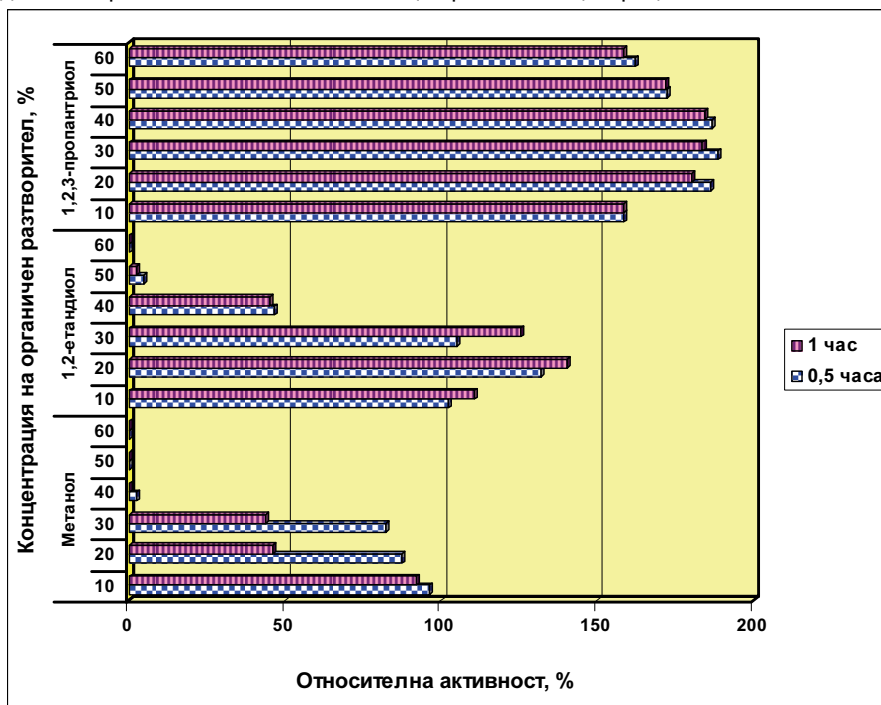
Интересно бе да се проследи същата зависимост при по-висока температура. За целта бяха проведени експерименти и при температура 40 оС – оптималната температура на свободния ензим.

Влиянието на концентрацията на трите органични разтворители при температура 40 оС върху относителната активност на β -галактозидазата е проследено на фиг. 2. При тази температура ензимът проявява най-висока относителна активност в присъствието 1,2,3-пропантриол, след това на 1,2-етандиол и най-накрая в присъствие на метанол. Този факт се потвърждава и от други автори, според които полиолите увеличават термостабилността на ензимите във водни разтвори [1] и стабилността им в органични разтворители. Колкото е по-голям броят на хидроксилните групи в органичния разтворител, броят на образуваните водородни връзки е по-голям и съответно стабилността на ензима при висока температура и в присъствие на органични разтворители се повишава.. При всички изследвани концентрации на 1,2,3-пропантриол относителната активност на β -галактозидазата е много по-висока от 100%, като най-висока е в концентрационния

интервал 20 – 40% разтворител. И тук тенденцията е, че по-голямо активиране на ензима се наблюдава на 0,5 час, след което с течение на времето относителната активност намалява незначително.

Критичната концентрация на 1,2-етандиол, при която настъпва чувствителна дезактивация на ензима е 40% (относителната активност на 0,5 час е 46,8%, а на първия час 45,2%). До 30% концентрация на този разтворител ензимът се активира, като най-добри резултати са получени в присъствие на 20% 1,2-етандиол. От фиг. 2 се вижда, че в присъствие на 60% разтворител ензимът губи напълно своята активност.

В присъствие на метанол активиране на ензима не се наблюдава. Частична дезактивация на ензима е отчетена още при 10% разтворител (относителна активност 96,3% на 0,5 час и 92% на първия час). В присъствие на 20% и 30% метанол относителната активност на ензима на 0,5 час намалява незначително, докато на първия час понижението е значително – до около 45%. Пълно дезактивиране на ензима настъпва още при 40% концентрация на метанол.



Фиг. 2. Влияние на концентрацията на органичните разтворители върху относителната активност на свободната β -галактозидаза. Ензимът е инкубиран на продължение на 1 час при температура 40 оС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изследвано е влиянието на три органични разтворителя (метанол; 1,2-етандиол; 1,2,3-пропантриол) върху активността и термичната стабилност на ензима β -галактозидаза:

1. Установено е, че при температура 20 оС, ензимът се активира в присъствие на всички органични разтворители и при всички изследвани концентрации (10% - 60%);

2. При температура 20 оС е установена корелация между количество хидроксилни групи в разтворителя и относителна активност на ензима. Най-висока активност (около 2 пъти по-висока от първоначалната) ензима проявява в присъствие на 1,2,3-пропантриол;

3. При по-висока температура (40 оС) по-добър активиращ и стабилизиращ ефект проявява 1,2,3-пропантриола.

ЛИТЕРАТУРА

[1]. Back J. F., D. Oakenfull, M. B. Smith. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry*, 1979, 23, 5191-5196.

[2]. Badoei-Dalfard A., K. Khajeh, S. M. Asghari, B. Ranjbar, H. R. Karbalaei-Heidari. Enhanced activity and stability in the presence of organic solvents by increased active site polarity and stabilization of a surface loop in a metalloprotease. *Analytical Biochemistry*, 2007, 370, (1), 107-114.

[3]. Clark D. S. Characteristics of nearly dry enzymes in organic solvents: implications for biocatalysis in the absence of water. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2004, 359 (1448): 1299-1307.

[4]. Chen W., H. Chen, Y. Xia, J. Yang, J. Zhao, F. Tian, H. P. Zhang, H. Zhang – Immobilization of recombinant thermostable β -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* from lactose hydrolysis in milk, *J. Dairy Sci.*, 92, 2, 2009, 491-498.

[5]. Gaertner H. F., A. J. Puigserver. Protein-protein interaction in low water organic media. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 36, 602-607.

[6]. Godjevargova T., N. Vasileva, Zl. Letskovska. Study of the thermal stability of glucose oxidase in the presence of water-soluble polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 2003, 90, 1393-1397.

[7]. Gupta M. N., R. Batra, R. Tyagi, A. Sharma. Polarity index: the guiding solvent parameter for enzyme stability in aqueous-organic cosolvent mixtures. *Biotechnology Progress*, 1997, 13, (3), 284-288.

[8]. Gupta M. N., I. Roy. *Eur. Journal Biochemistry*, 2004, 271, 2575 – 2583.

[9]. Halling P. J. *Philosophical Transactions of the Royal Society London, Ser B: Biological Sciences*, 2004, 359, 1287-1297.

[10]. Hronska H., M. Rosenberg, Z. Grosova – Milk lactose hydrolysis by beta-galactosidase immobilized in polyvinylalcohol hydrogel, *New Biotechnology*, 25, 2009, S118.

[11]. Hudson E. P., R. K. Eppler, D. S. Clark. *Curr. Opin. Biotechnol*, 2005, 16, 637 – 643.

[12]. Ken-ichi I., Y. Sumie, T. Yasushi. The effects of additives on the stability of freeze-dried β -galactosidase stored at elevated temperature. *International Journal of Pharmaceutics*, 1991, 71, (1-2), 137-146.

[13]. Kuby S. A., H. S. Lardy, *Journal of the American Chemical Society*, 75, 1953, 890-896.

[14]. Li X., Q. Z. K. Zhou, X. D. Chen – Pilot-scale lactose hydrolysis using β – galactosidase immobilized on cotton fabric, *Chemical Engineering and Processing*, 46, 2007, 497-500.

[15]. Lowry L., N. Rosenbough, H. Farr, *J. Chem.* 193, 1951, 265.

[16]. Mariotti M. P., H. Yamanaka, A. R. Araujo, H. C. Trevisan - Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -Galactosidase, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51, 6, 2008, 1233-1240.

[17]. Mozhaev V. V., Yu. L. Khmelnskiy, M. V. Sergeeva, A. B. Belova, N. L. Klyachko, A. V. Levashov, K. Martinek. *Eur. J. Biochem.*, 1989, 184, 597-602.

[18]. Mozhaev V. V., M. V. Sergeeva, A. B. Belova, Yu. L. Khmel'nitsky. Multipoint attachment to a support protects enzyme from inactivation by organic solvents: α -chymotrypsin in aqueous solutions of alcohols and diols. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 35, 653-659.

[19]. Otamiri M., P. Adlercreutz, B. Mattiasson. A differential scanning calorimetric study of chymotrypsin in the presence of added polymers. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 44, 73-78.

[20]. Szczodrak J. - Hydrolysis of lactose in whey permeate by Immobilized β - galactosidase from *Penicillium notatum*, *Acta Biotechnologica*, 19, 3, 2004, 235-250.

[21]. Vasileva N., Ts. Godjevargova. Study of the effect of some organic solvents on the activity and stability of glucose oxidase. *Materials Science and Engineering C*, 2005, 25, 17-21.

[22]. Wierzbicki L. E., V. H. Edwards, F. V. Kosikowski – Hydrolysis of lactose in acid whey using β -galactosidase immobilized on porous glass particles: Preparation and characterization of a reusable catalyst for the production of low-lactose dairy products, *Biotechnology and Bioengineering*, 16, 3, 2004, 397-411.

[23]. Wiggers H. J., J. Cheleski, A. Zottis, G. Oliva, A. D. Andricopulo, C. A. Montanari. Effects of organic solvents on the enzyme activity of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in calorimetric assays. *Anal. Biochem.*, 2007, 370, (1), 107-114.

За контакти:

1. доц. д-р инж. Настя Василева Иванова, Филиал – Разград, Русенски университет „Ангел Кънчев“, тел. 084/611012, e-mail: nastiav2001@yahoo.com.

2. ас. Владислав Иванов Йотов, Филиал – Разград, Русенски университет „Ангел Кънчев“, тел. 084/611012, e-mail: vlado.yotov@abv.bg.

3. проф. д-р Цонка Иванова Годжевъргова, Бургаски университет «проф. д-р Асен Златаров», тел. 056/858353, e-mail: godjevargova@yahoo.com.

Докладът е рецензиран

РУСЕНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „АНГЕЛ КЪНЧЕВ“
UNIVERSITY OF RUSE „ANGEL KANCHEV“

ДИПЛОМА

Програмният комитет на
Научната конференция RU&SU'11
награждава с КРИСТАЛЕН ПРИЗ
“THE BEST PAPER”

НАСТЯ ВАСИЛЕВА, ВЛАДИСЛАВ ЙОТОВ,
ЦОНКА ГОДЖЕВЪРГОВА

автори на доклада

“Изследване влиянието на някои алкохоли върху
активността и стабилността на ензима β -галактозидаза

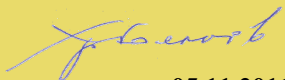
DIPLOMA

The Programme Committee of
the Scientific Conference RU&SU'11
awards the Crystal Prize "THE BEST PAPER"
to NASTIA VASILEVA, VLADISLAV JOTOV,
TSONKA GODJEVARGOVA

authors of the paper

“ Study of the effect of some alcohols on the activity
and stability of of β -galactosidase enzyme”

РЕКТОР
RECTOR



Проф. д.т.н. Христо Белоев
Prof. DSc Hristo Beloev

05.11.2011