

СТРУКТУРА И АКТИВНОСТЬ ГРИБКОВЫХ ЛИПАЗ В РАСТВОРАХ СОЛЕЙ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ

© 2016 г. Л.Р. Богданова, Д.Р. Бакирова, Ю.А. Валиуллина, Б.З. Идиятуллин,
Д.А. Файзуллин, О.С. Зуева*, Ю.Ф. Зуев

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН,
420111, Казань, ул. Лобачевского, 2/31, а/я 30

E-mail: yufzuev@mail.ru

*Казанский государственный энергетический университет, 420066, Казань, ул. Красносельская, 51

Поступила в редакцию 28.10.15 г.

Исследованы изменения структуры и каталитических свойств грибковых липаз (*Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor javanicus*) в мицеллярных растворах ряда солей желчных кислот, отличающихся гидрофильно-липофильным балансом и свойствами реакционной среды. Оценка изменения структуры белков в комплексах с мицеллами солей желчных кислот проводилась методами кругового дихроизма и флуоресценции триптофановых остатков. Соли желчных кислот не оказывают существенного влияния на структуру исследованных ферментов: в липазах *Rh. miehei* и *M. javanicus* наблюдается незначительное уменьшение доли α -спиральных участков, влияние солей желчных кислот на структуру липазы *C. rugosa* не выявлено. Несмотря на незначительные изменения в структуре ферментов, в растворах солей желчных кислот наблюдается существенное изменение их каталитических свойств: резкое снижение эффективности катализа. Методом ЯМР-самодиффузии показано образование комплексов субстрат-мицелла солей желчных кислот. Предложена модель регуляции активности грибковых липаз в растворах солей желчных кислот.

Ключевые слова: грибковые липазы, соли желчных кислот, мицеллы, солюбилизация, ингибирование.

Липазы (триацилглицеролгидролазы, КФ 3.1.1.3) – многообразное семейство ферментов, катализирующих гидролиз сложноэфирных связей в липидах. Липазы широко распространены у млекопитающих, растений, дрожжей и бактерий. Микробные липазы нашли широкое применение в различных областях хозяйственной деятельности: в производстве масел, сыра, синтетических моющих средств, в фармакологии и медицине, хотя известно, что бесконтрольный липолиз приводит к ухудшению качества конечного продукта [1–4]. Исследования механизмов регуляции активности липаз являются важной задачей, результаты которой могут иметь значение при разработке фармакологических препаратов и в различных технологических процессах.

Особенностью ферментативного действия липаз являются условия катализируемых ими реакций. Липазы гидрофильны, в то время как их субстраты представляют собой гидрофобные

соединения. Известно [5–7], что активность липаз резко возрастает при концентрациях субстрата выше предела его растворимости, т.е. при появлении в системе жировых капель и поверхности раздела фаз. Данное явление получило название поверхностной активации. Это открывает определенные возможности для регуляции активности липаз посредством изменения физико-химических характеристик гидрофобной фазы, включая свойства поверхности раздела фаз, что можно осуществить введением в реакционную среду амфифильных соединений [7,8].

Соли желчных кислот (СЖК) являются природными амфифильными веществами с уникальным строением и мицеллообразующими свойствами, играющими важную роль в метаболизме липидов [9,10]. Для них характерна плоскостная амфифильность, т.е. гидрофильные и гидрофобные группы расположены по разным сторонам стеранового остова этих молекул. Это отражается на характере агрегации СЖК: они образуют сравнительно небольшие мицеллы с низкой солюбилизационной емкостью, и, в отличие от классических поверхностно-активных

Сокращения: СЖК – соли желчных кислот, ПНФЛ – *n*-нитрофениллаурат, ХН – холат натрия, ДХН – дезоксихолат натрия, ХДХН – хенодезоксихолат натрия, КСД – коэффициент самодиффузии.

веществ, размер их мицелл увеличивается с концентрацией [11–13].

Изучению активности липаз в растворах СЖК посвящено немало работ. Исследователи обращают внимание на колоколообразный характер зависимости липолитической активности от концентрации СЖК, связывая его с изменениями структуры фермента в присутствии амфифилов [6–8,14]. Однако подобное объяснение имеет ряд противоречий, подробно рассмотренных в обзоре [15].

Цель настоящей работы заключается в поиске механизмов регуляции активности грибковых липаз путем модификации структуры ферментов и условий прохождения реакций в присутствии СЖК. Нами предпринята попытка изменения условий ферментативной реакции посредством перебора ряда СЖК с последовательным изменением их гидрофильно-липофильного баланса, а следовательно, и свойств реакционной среды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали грибковые липазы *Candida rugosa* (*C. rugosa*), *Mucor javanicus* (*M. javanicus*) и *Rhizomucor miehei* (*Rh. miehei*) (Sigma, США). В качестве субстрата в ферментативных реакциях использовали *n*-нитрофениловый эфир лауриновой (додекановой) кислоты (ПНФЛ) (MP Biomedicals LLC, США; чистота 98,9%). Для изменения состава реакционной среды использовались натриевые соли хеновой (ХН), дезоксихолевой (ДХН) и хенодезоксихолевой кислот (ХДХН) производства Sigma (США).

Кинетические измерения проводили на спектрофотометре Lambda 25 (Perkin Elmer, США) с термостатируемым кюветным отделением. За скоростью гидролиза ПНФЛ следили по изменению оптической плотности при 400 нм (поглощение анионной формы *n*-нитрофенола). Реакцию проводили в натрий-фосфатном буфере при pH 7,4 и 25°C. Для определения кинетических параметров реакции использовали метод двойных обратных координат.

Для регистрации спектров флуоресценции остатков триптофана в липазах использовали спектрофлуориметр «Флюорат-02-Панорама» («Люмэкс», Россия). Спектры записывали в натрий-фосфатном буфере и в 12 мМ растворах СЖК в диапазоне 300–400 нм при длине волны возбуждения 295 нм.

Спектры кругового дихроизма липаз снимали в натрий-фосфатном буфере и в 12 мМ растворе холата натрия при 25°C на приборе Jasco J-1500 CD Spectrometer (Jasco, Германия), используя кювету с длиной оптического пути

0,1 см. Для оценки содержания элементов вторичной структуры использовали онлайн-программу DichroWeb (программы анализа CDSSTR #4, CDSSTR #7, CDSSTR #SMP180).

Измерения коэффициентов самодиффузии (КСД) ДХН и ПНФЛ выполнены на ЯМР-спектрометре AVANCE III (Bruker, Германия) с датчиком TXI 5 мм, оснащенным градиентной катушкой. Для измерения КСД использована импульсная последовательность «стимулированное эхо» с биполярными градиентами. Измерения КСД проведены на ядрах протонов ¹H (600,13 МГц). Градиент магнитного поля в экспериментах изменяли в интервале от 0 до 0,5 Тл·м⁻¹ при постоянном времени диффузии и длительности импульсов градиента магнитного поля.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Липазы, использованные в настоящем исследовании, имеют грибковое происхождение. Липазы *C. rugosa* и *Rh. miehei* достаточно хорошо изучены: это глобулярные белки, содержащие 534 и 269 аминокислотных остатка соответственно. Их строение соответствует общим принципам структурной организации микробных липаз, в частности, имеется амфифильная поверхностная полипептидная петля, образующая «крышку», с наличием которой многие исследователи связывают явление поверхностной активации [16–18]. Информация о трехмерной структуре липазы *M. javanicus* в настоящее время отсутствует. Используемые липазы катализируют широкий круг реакций гидролиза/синтеза различных соединений: три-, ди- и моноглицеридов жирных кислот, синтетических сложных эфиров [16,19,20]. Если липаза *C. rugosa* не обладает позиционной специфичностью, то липазы *Rh. miehei* и *M. javanicus*, напротив, являются 1,3-специфичными по отношению к триглицеридам [17,21].

Нами исследовано изменение активности исследуемых липаз в зависимости от концентрации СЖК. На рис. 1 в качестве примера представлены зависимости активности липаз в растворе ХН. Наблюдается волнообразное изменение активности ферментов: с ростом концентрации ХН скорость реакции уменьшается, достигая минимума при 6 мМ, затем происходит «реактивация», активность фермента восстанавливается (12 мМ) и снова падает. Аналогичные результаты с максимумами активности при 5 и 7 мМ были получены в растворах соответственно ДХН и ХДХН. Максимум активности ферментов в растворах СЖК располагается вблизи критической концентрации мицеллооб-

Таблица 1. Изменение основных кинетических параметров реакции гидролиза ПНФЛ липазами *C. rugosa*, *Rh. miehei* и *M. javanicus* в буфере и в 12 мМ растворе холата натрия

Белок	Система	K_M , 10^{-6} М	k_{cat} , c^{-1}	s , $10^6 (M \cdot c)^{-1}$
<i>C. rugosa</i>	Буфер	10	27,2	2,7
	ХН	15	15,3	1
<i>Rh. miehei</i>	Буфер	19	48	2,5
	ХН	234	10,5	0,04
<i>M. javanicus</i>	Буфер	6	0,32	0,05
	ХН	50	0,30	0,006

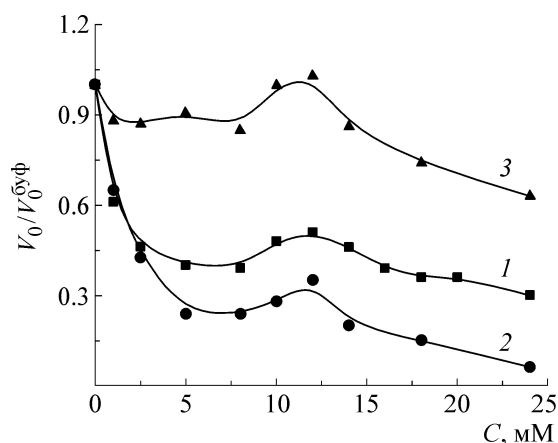
разования этих амфифилов (9,7; 2,8 и 3,7 мМ для ХН, ДХН и ХДХН соответственно [13]). В целом СЖК оказывают ингибирующее действие на исследуемые липазы, которое возрастает в ряду *M. javanicus* – *C. rugosa* – *Rh. miehei*.

Для выяснения механизмов, лежащих в основе подобного изменения активности, были определены кинетические параметры исследуемой реакции (константа Михаэлиса K_M , каталитическая константа k_{cat} , эффективность катализа $s = k_{cat}/K_M$), которые наиболее полно характеризуют каталитический процесс (табл. 1). В растворе ХН наблюдается резкое снижение эффективности катализа по сравнению с буфером, вызванное уменьшением каталитической константы и увеличением константы Михаэлиса. Наиболее существенные изменения этих величин происходят в случае липазы *Rh. miehei*, для которой наблюдается 60-кратное снижение эффективности катализа. Для исследованных ферментов эти изменения наименее выражены в случае липазы *C. rugosa*. Аналогичные тенденции наблюдались в растворах ДХН и ХДХН (данные не приводятся). Интересно отметить, что по силе ингибирующего действия СЖК выстраиваются в ряд в соответствии с уменьшением их гидрофильно-липофильного баланса (ХН < ДХН < ХДХН). Таким образом, проведенный анализ показал, что СЖК оказывают многофакторное воздействие на каталитическую систему, влияя на связывание фермента с субстратом и на последующие стадии каталитического процесса.

Для понимания причин наблюдаемого изменения активности и для поиска возможных способов регуляции активности липаз мы провели всестороннее исследование механизмов влияния СЖК на каталитическую систему: оценили воздействие СЖК на структуру ферментов, с одной стороны, и на форму организации субстрата в растворе – с другой.

Для оценки влияния СЖК на структуру ферментов использовали взаимодополняющие методы триптофановой флуоресценции и кру-

гового дихроизма. Доступность триптофана контакту с растворителем влияет на его флуоресценцию, благодаря чему спектр испускания триптофановых остатков характеризует полярность их ближайшего окружения [22]. Детальный анализ триптофановой флуоресценции затрудняется наличием в большинстве белков нескольких триптофановых остатков. Так как каждый остаток находится в разном окружении, спектральные свойства каждого остатка в общем случае различаются. Липазы *C. rugosa* и *Rh. miehei* содержат 5 и 4 триптофановых остатка соответственно [16,18], для липазы *M. javanicus* эта информация в настоящий момент отсутствует. Для анализа полученных интегральных спектров флуоресценции мы использовали модель дискретных состояний, согласно которой все триптофановые остатки в белках подразделяются на пять классов со строго определенными диапазонами длины волны флуоресценции, определяемыми локальным микроокружением триптофанов в белке [23]. Используя известный алгоритм разложения спектров триптофановой флуоресценции белков [24], нами установлено, что для липаз *C. rugosa* и

**Рис. 1.** Изменение начальной скорости реакции ферментативного гидролиза ПНФЛ в растворах холата натрия разной концентрации: 1 – *C. rugosa*, 2 – *Rh. miehei*, 3 – *M. javanicus*.

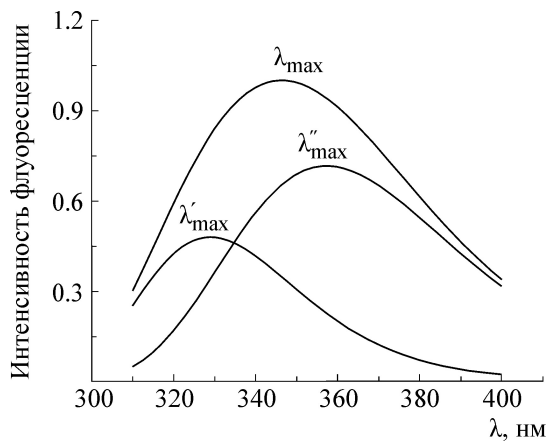


Рис. 2. Спектр триптофановой флуоресценции липазы *C. rugosa* в буфере и результат его разложения на компоненты.

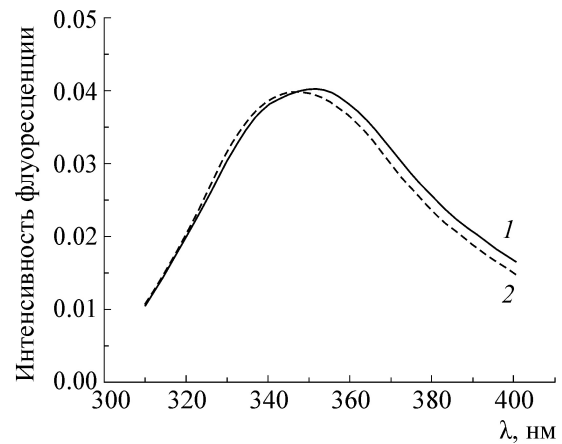


Рис. 3. Спектр флуоресценции липазы *M. javanicus* в буфере (1) и в 12 мМ растворе ХН (2).

Rh. miehei в буфере спектр состоит из двух компонент. Пример разложения спектра суммарной флуоресценции на отдельные компоненты представлен на рис. 2. Этот подход был применен к спектрам суммарной флуоресценции липаз в растворах исследуемых СЖК. В табл. 2 приведены результаты для белков, находящихся в буфере и в 12 мМ растворе ХН. Согласно данным триптофановой флуоресценции, липазы *C. rugosa* и *Rh. miehei* не претерпевают существенных структурных изменений в растворах СЖК. Показано, что максимум суммарной флуоресценции липазы *Rh. miehei* в растворе ХН не сдвигается, однако наблюдается bathochromный сдвиг максимума коротковолновой компоненты на 1,6 нм, вызванный разворачиванием белка. Для липазы *C. rugosa* наблюдается гипсохромный сдвиг максимума суммарной флуоресценции, вызванный перераспределением интенсивностей отдельных компонент, и незначительный bathochromный сдвиг длинноволновой компоненты. В случае липазы *M. javanicus* анализ полученных спектров флуоресценции был затруднен отсутствием информации об аминокислотном составе этого белка. Од-

нако уширенная форма спектра (полуширина пиков 60–70 нм) позволяет предположить наличие как минимум двух компонент (рис. 3). Мы наблюдали существенный (на 3–5 нм) гипсохромный сдвиг максимума суммарной флуоресценции этого белка в растворах всех исследованных СЖК, скорее всего, вызванный, как и в случае *C. rugosa*, перераспределением интенсивностей отдельных компонент. Другая возможная причина наблюдаемых изменений – уменьшение полярности микроокружения триптофановых остатков вследствие вытеснения молекул воды с поверхности белка при образовании комплексов липаза–мицеллы СЖК. Таким образом, согласно данным триптофановой флуоресценции, наибольшие структурные изменения наблюдаются в случае липазы *M. javanicus*. Тем не менее именно для этого фермента мы наблюдали наименьшее снижение активности в растворах СЖК (рис. 1).

Основным недостатком метода триптофановой флуоресценции является то, что он не дает информации о структуре всего белка, включая участки структуры, задействованные в катализе. Он позволяет судить только о фрагментах молекулы, располагающихся в непосред-

Таблица 2. Положение максимумов суммарной флуоресценции (λ_{\max}) липаз и положения максимумов компонент (λ_{\max}^I и λ_{\max}^{II}) в буфере и в растворах СЖК

Белок	Система	λ_{\max} , нм	λ_{\max}^I , нм	λ_{\max}^{II} , нм
<i>C. rugosa</i>	буфер	346,0	328,6	356,6
	ХН	345,2	328,5	357,3
<i>Rh. miehei</i>	буфер	336,0	325,2	344,0
	ХН	336,1	326,8	344,3
<i>M. javanicus</i>	буфер	349,3		
	ХН	346,8		

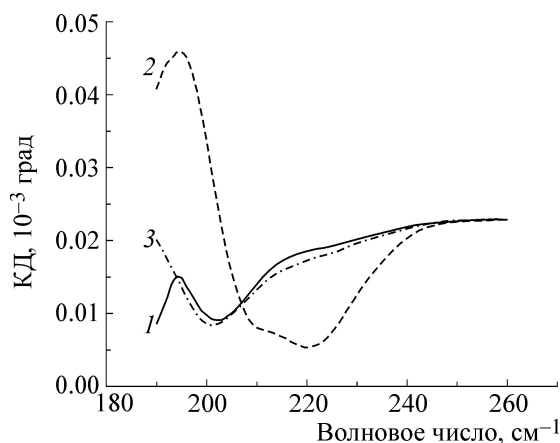


Рис. 4. Спектры кругового дихроизма липаз в буфере: 1 – *C. rugosa* (0,075 мг/мл), 2 – *Rh. miehei* (0,141 мг/мл), 3 – *M. javanicus* (0,111 мг/мл).

ственной близости от триптофановых остатков. Этого недостатка лишен метод кругового дихроизма [25,26], который мы также использовали для оценки влияния СЖК на структуру липаз. Были получены спектры кругового дихроизма для трех исследуемых липаз в буфере (рис. 4) и в 12 мМ растворе ХН и проведена их математическая обработка для определения долей отдельных компонент вторичной структуры [26] (рис. 5). Наши исследования показали, что в целом присутствие 12 мМ холата натрия не влияет значительно на конформацию белков. Липаза *Rh. miehei* содержит наибольшее количество α -спиральной структуры по сравнению с двумя другими липазами, при этом все три липазы имеют в основном структуру β -слоев и неупорядоченную структуру. Добавление холата натрия приводит к незначительному уменьшению доли α -спиральных участков в липазах *Rh. miehei* и *M. javanicus*, тогда как влияние холата натрия на липазу *C. rugosa* не выявлено. Возможно, это объясняет наблюдаемое нами наименьшее изменение эффективности катализа липазой *C. rugosa* по сравнению с двумя другими ферментами (табл. 1). Установлено, что присутствие ХН в растворе белков приводит к уменьшению содержания неупорядоченной структуры в липазах *C. rugosa* и *M. javanicus*. В липазе *Rh. miehei* при добавлении ХН часть белка, вероятно, переходит в неупорядоченное состояние.

Таким образом, согласно данным триптофановой флуоресценции и кругового дихроизма, в растворах СЖК не происходит существенного изменения структуры ферментов. Сопоставив полученные результаты с данными по каталитической активности, мы пришли к вы-

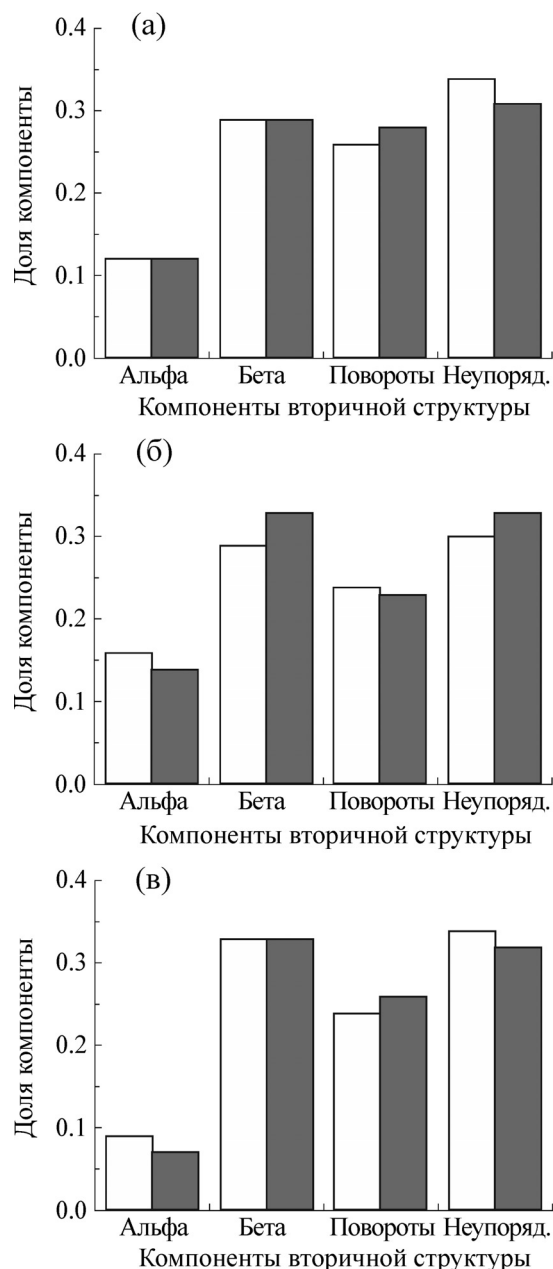


Рис. 5. Результаты разложения спектров кругового дихроизма липаз на компоненты вторичной структуры в буфере и в 12 мМ растворе холата натрия (белый и серый столбики соответственно): (а) – *C. rugosa*, (б) – *Rh. miehei*, (в) – *M. javanicus*.

воду, что наблюдаемые незначительные вариации структуры липаз не могут быть основной причиной наблюдаемого немоного изменения их каталитических свойств. Очевидно, что в основе ингибирующего действия СЖК лежит механизм, отличный от модификации структуры ферментов.

Альтернативный механизм изменения активности липаз может быть связан с изменением

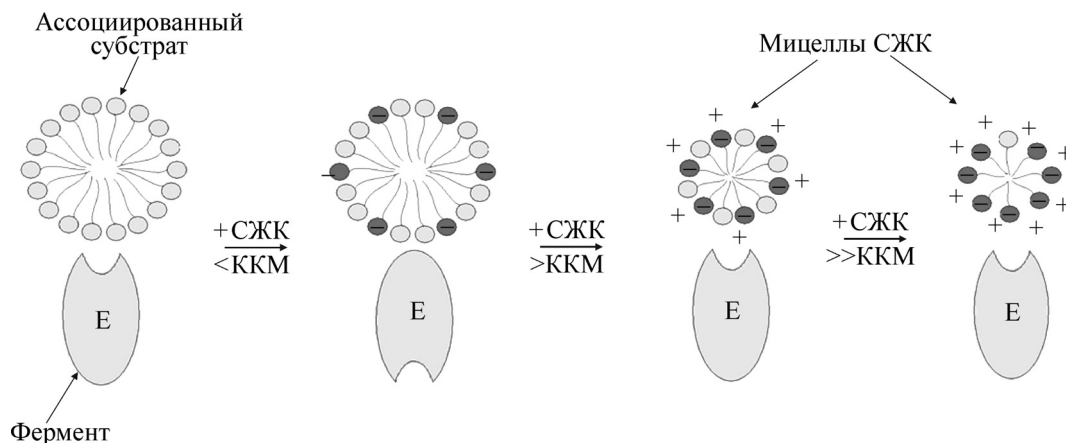
Таблица 3. Влияние концентрации ДХН на коэффициент самодиффузии и гидродинамический радиус ассоциатов ПНФЛ

$[C_{ДХН}]$, мМ	$KCD_{ДХН}$, 10^{-10} м ² /с	$KCD_{ПНФЛ}$, 10^{-10} м ² /с	$R_{ПНФЛ}$, нМ
0		0,09	20
0.1	4,29	0,037	48
2.5	4,28	0,06	30
5	4,08	0,23	7,8
7	4,00	0,63	2,9
10	3,24	0,70	2,5
19	2,40	1,50	1,2
30	1,90	1,25	1,4

условий реакционного контакта субстрата с ферментом в присутствии СЖК [6–8]. Используемый субстрат в силу своего амфифильного строения плохо растворим в воде и образует коллоидные (мицеллярные) агрегаты уже при концентрациях выше 10 мкМ [19]. Метод ЯМР-самодиффузии [27] позволил нам проследить, как меняется структура коллоидной системы, образованной субстратом, при добавлении СЖК. Молекулы субстрата при низких концентрациях СЖК существуют в виде больших ассоциатов, размер которых превышает размер молекулы ДХН как минимум на два порядка (табл. 3). С ростом концентрации СЖК мы наблюдали сближение значений КСД солей желчных кислот и субстрата, вызванное взаимодействием ПНФЛ с СЖК и образованием ими смешанных агрегатов. При увеличении концентрации СЖК размер частиц субстрата сначала плавно, а при достижении критической концентрации мицеллообразования резко уменьшается. Естественно предположить, что при образовании смешанных агрегатов ПНФЛ и СЖК меняются свойства поверхности жировых капель и, вероятно, условия взаимодействия

субстрата с ферментом. Очевидно, что ниже критической концентрации мицеллообразования молекулы СЖК встраиваются в агрегаты, образованные водонерастворимым субстратом, и по достижении данной критической концентрации образующиеся мицеллы «растворяют» ПНФЛ за счет его сольubilизации, которая была подробно рассмотрена нами ранее [12,19]. При высоких концентрациях СЖК размер смешанных агрегатов не отличается от размера мицелл СЖК. Как и в случае с данными по активности ферментов, прослеживается корреляция между величиной ГЛБ СЖК и их сольubilизационной емкостью [28]. По мере увеличения гидрофобности амфифила в исследуемом ряду СЖК ($XН < ДХ < ХДХН$) растет сольubilизационная емкость и степень ингибирования ферментов.

Сопоставляя эти результаты с наблюдаемыми нами изменениями каталитических свойств липаз, можно заключить, что изменение структуры коллоидной системы, формируемой субстратом и СЖК, приводит к изменению особенностей взаимодействия фермента с субстратом (рис. 6). В отсутствие СЖК фермент свя-

**Рис. 6.** Модель функционирования липаз в растворах СЖК.

зывается с субстратом преимущественно за счет гидрофобных сил [7,8,28]. При концентрации СЖК ниже критической концентрации мицеллообразования на поверхности частиц субстрата формируется отрицательно заряженный монослой молекул СЖК, что препятствует сорбции отрицательно заряженной липазы и скорость ферментативной реакции уменьшается. По достижении критической концентрации структура коллоидной системы кардинально меняется. Мицеллярные агрегаты СЖК солюбилизируют гидрофобный субстрат, при этом отрицательный заряд головных групп СЖК в мицеллах скомпенсирован противоионами двойного электрического слоя и не препятствует контакту с липазой, что приводит к локальному концентрированию субстрата и ускорению липолитической реакции. Однако при дальнейшем увеличении концентрации СЖК и увеличении числа мицелл происходит «разбавление» субстрата и эффект концентрирования нивелируется.

Таким образом, в ходе проведенных исследований показано, что механизм регуляторного действия СЖК на каталитические свойства грибковых липаз в первую очередь связан с изменением локальных концентраций субстрата и условий формирования фермент-субстратного комплекса и отчасти подобен мицеллярному каталитическому эффекту, наблюдаемому для неферментативных реакций в растворах поверхностно-активных веществ [29,30].

Данная статья подготовлена по материалам V Съезда биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-03-31151 мол_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Woolley and S. B. Petersen, *Lipases – Their Structure, Biochemistry and Applications* (Cambridge University Press, Cambridge, 1994).
2. Y. Yang, Y. Yu, Y. Zhang, et al., *Process Biochem.* **46** (10), 1900 (2011).
3. Y. Yang, Y. Yu, D. Wu, et al., *Process Biochem.* **47** (7), 1027 (2012).
4. T. Tan, J. Lu, K. Nie, et al., *Biotech. Adv.* **28** (5), 628 (2010).
5. N. Miled, F. Beisson, J. de Caro, et al., *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **11** (4–6), 165 (2001).
6. R. Verger, *Trends Biotechnol.* **15** (1), 32 (1997).
7. A. Aloulou, J. A. Rodriguez, S. Fernandez, et al., *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids* **1761**, 995 (2006).
8. G. Fernandez-Lorente, Z. Cabrera, C. Godoy, et al., *Process Biochem.* **43**, 1061 (2008).
9. Y. Zhao, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **12**, 92 (2007).
10. S. Mukhopadhyay and U. Maitra, *Curr. Sci.* **87** (12), 1666 (2004).
11. D. Madenci and S. U. Egelhaaf, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **15**, 109 (2010).
12. Л. Р. Богданова, О. И. Гнездилов, Б. З. Идиятуллин и др., *Коллоид. журн.* **74** (1), 3 (2012).
13. Ю. А. Валиуллина, Л. Р. Богданова, Б. З. Идиятуллин и др., *Изв. Уфимского научного центра РАН* **3**, 63 (2014).
14. P. Reis, H. Watzke, M. Leser, et al., *Biophys. Chem.* **147**, 93 (2010).
15. P. Reis, K. Holmberg, H. Watzke, et al., *Adv. Colloid Interface Sci.* **147–148**, 237 (2009).
16. P. Grochulski, F. Bouthillier, R. J. Kazauskas, et al., *Biochemistry* **33**, 3494 (1994).
17. R. C. Rodrigues and R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **66** (1–2), 15 (2010).
18. Z. S. Derewenda and U. Derewenda, *J. Mol. Biol.* **227**, 818 (1992).
19. Л. Р. Богданова, Е. А. Ермакова, Б. З. Идиятуллин и др., *Докл. АН* **446** (4), 456 (2012).
20. Л. Р. Богданова, Т. А. Коннова и Ю. Ф. Зуев, *Изв. Уфимского научного центра РАН* **3**, 60 (2014).
21. C. Garcia-Galan, O. Barbosa, C. Ortiz, et al., *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **93**, 34 (2013).
22. F. Sun, W. Zong, R. Liu, et al., *Spectrochim. Acta Part A* **76**, 142 (2010).
23. Ya. K. Reshetnyak and E. A. Burstein, *Biophys. J.* **81** (3), 1710 (2001).
24. E. A. Burstein, S. M. Abornev, and Ya. K. Reshetnyak, *Biophys. J.* **81** (3), 1699 (2001).
25. N. Greenfield, *Nature Protocols* **1**, 2876 (2007).
26. S. M. Kelly, T. J. Jess, and N. C. Price, *Biochim. Biophys. Acta* **1751**, 119 (2005).
27. Ю. Ф. Зуев, О. И. Гнездилов, О. С. Зуева и О. Г. Усыров, *Коллоид. журн.* **73** (1), 43 (2011).
28. Л. Р. Богданова, Дис. ...канд. биол. наук (КИББ КазНЦ РАН, Казань, 2012).
29. А. Б. Миргородская, Л. А. Кудрявцева, Ю. Ф. Зуев и др., *Журн. физ. химии* **76** (11), 2033 (2002).
30. E. A. Stupishina, D. A. Faizullin, N. L. Zakharchenko, et al., *Mendeleev Communications* **11** (6), 237 (2001).

Structure and Activity of Fungal Lipases in Bile Salt Solutions

L.R. Bogdanova*, D.R. Bakirova*, Yu.A. Valiullina*, B.Z. Idiyatullin*, D.A. Faizullin*,
O.S. Zueva**, and Yu.F. Zuev*

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences,
ul. Lobachevskogo 2/31, Post-Office Box 30, Kazan, 420111 Russia

**Kazan State Power Engineering University, ul. Krasnoselskaya 51, Kazan, 420066 Russia

The changes in structure and catalytic properties of fungal lipases (*Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor javanicus*) were investigated in micellar solutions of bile salts that differ in hydrophilic-lipophilic balance and reaction medium properties. The methods of circular dichroism and tryptophan fluorescence were applied to estimate the changes in peptide structure within complexes with bile salt micelles. Bile salts do not exert a significant influence on the structure of the enzymes under study: in *Rh. miehei* and *M. javanicus* lipases the alpha helix content slightly decreased, the influence of bile salts on the *C. rugosa* structure was not revealed. Despite negligible structural modifications in the enzymes, in bile salt solutions a considerable change in their catalytic properties was observed: an abrupt decrease in catalytic effectiveness. Substrate-bile salts micelles complex formation was demonstrated by the NMR self-diffusion method. The model of a regulation of fungal lipase activity was proposed.

Key words: fungal lipases, bile salts, micelles, solubilization, inhibition