

УДК 577.152.3

# ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВЫСОКООЧИЩЕННОЙ СВЯЗАННОЙ С КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКОЙ $\beta$ -ГЛЮКОЗИДАЗЫ РАСТЕНИЙ ГОРОХА

**ЕРШОВА Антонина Николаевна,**

доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой биологии растений и животных

**ФАТУЛЛАЕВА Айнур Садулла кызы,**

аспирант кафедры биологии растений и животных

Воронежский государственный педагогический университет

**АННОТАЦИЯ.** Разработана схема получения высокоочищенного электрофоретически гомогенного ферментного препарата связанной с клеточной стенкой  $\beta$ -глюкозидазы проростков гороха, которая включала высаливание сульфатом аммония и гель-хроматографию на G-25 и G-100. Установлено, что исследуемый фермент является мономером, который с максимальной скоростью расщепляет субстраты при pH 4,8 и 37°C. Фермент обладает достаточно широкой специфичностью и катализирует гидролиз  $\beta$ -гликозидных связей не только в специфическом для растения гороха изосуццинимид- $\beta$ -D-гликозиде, но и других дисахаридах, алкил- и арилглюкопиранозидах. Определены значения величин  $K_m$  и  $V_{max}$  по отношению к природным и синтетическим гликозидам. Показано, что в каталитическом центре  $\beta$ -глюкозидазы клеточной стенки присутствуют карбоксильная группа глутаминовой либо аспарагиновой кислот и имидазольная группа гистидина.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** горох, изосуццинимид- $\beta$ -D-гликозид,  $\beta$ -глюкозидаза, физико-химические свойства, функциональные группы.

**ERSHOVA A. N.,**

Dr. Biol. Sci., Professor, Head of the Department of Biology of Plants and Animals

Voronezh State Pedagogical University

**FATULLAEVA A. S.,**

Post-graduate student, Department of Biology of Plants and Animals

Voronezh State Pedagogical University

## PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF HIGHLY PURIFIED CELL WALL-BOUND -GLUCOSIDASE OF PEA PLANTS

**ABSTRACT.** We suggest a scheme for obtaining the highly purified electrophoretically homogenic enzymatic agent of cell wall-bound  $\beta$ -glucosidase of pea plants, which involves salting out with ammonia sulphate and gel chromatography with G-25 and G-100. It was discovered that the examined enzyme is a monomer, which splits substrates under pH 4.8 and 37°C with the peak speed. The enzyme performs a relatively high specificity and catalyzes the hydrolysis of  $\beta$ -glycoside bonds not only in pea plants specific isosuccinimide- $\beta$ -D-glycoside, but also in other disaccharides, alkyl- and arylglucopyranosides. The values of  $KM$  and  $VMAX$  with respect to the natural and synthetic glycosides are determined. It is shown that in the catalytic site of cell wall-bound  $\beta$ -glucosidase, a carboxyl group of the glutamic or asparagine acid and an imidazole group of the histidine is present.

**KEY WORDS:** pea, isosuccinimide- $\beta$ -D-glycoside,  $\beta$ -glucosidase, physical and chemical properties, functional groups.

## Введение

Клеточная стенка является важнейшим динамическим компартментом растительной клетки, на которой адсорбируются ряд ферментов, включая и  $\beta$ -глюкозидазы (КФ 3.2.1. 21) [1]. Ферменты  $\beta$ -глюкозидазы составляют основную группу среди гликозидгидролаз, обнаруженных и выделенных из представителей всех царств живых организмов. В отличие от бактериальных,  $\beta$ -глюкозидазы растений изучены в меньшей степени [2,3].  $\beta$ -Глюкозидазы могут локализоваться в различных компартментах растительной клетки и катализируют гидролиз  $\beta$ -глюкозидной связи как в  $\beta$ -D-арил, так и олигоглюкопиранозидсах [4].  $\beta$ -Глюкозидазы листьев растений овса, кукурузы, фасоли, подсолнечника и картофеля были обнаружены в основном во фракции клеточных стенок [5]. Однако местом их локализации могут быть цитоплазма или вакуоль, где находятся расщепляемые ими гликозиды [6].

Растительные глюкозидазы значительно отличаются от бактериальных и проявляют максимальную активность при pH 4-6 и температуре +30-50°C [5]. Ранее в проростках гороха был обнаружен специфический гликозид – изосукцинимид- $\beta$ -D-гликозид (ИС-гликозид), обладающий выраженной биологической активностью [7]. Предшественником агликона этого гликозида являлось циклическое производное  $\gamma$ -аминомасляная кислота (ГАМК) [8]. ИС-гликозид мог служить донором глюкозы как в синтезе других гликозидов, например, этил- $\beta$ -гликозида, так и в синтезе веществ клеточной стенки [9]. Было показано, что активность цитоплазматической и связанных с клеточной стенкой молекулярных форм фермента менялась в ходе онтогенеза растений гороха и под влиянием гипоксии [10]. Однако для исследования свойств обнаруженных в проростках молекулярных форм  $\beta$ -глюкозидазы, необходимо было получить их в высокоочищенном состоянии. В связи с этим, целью работы была разработка методики получения высокоочищенных электрофоретически гомогенных препаратов фермента клеточных стенок растений гороха, изучение ряда физико-химических свойств и определение функциональных групп в активном центре данного фермента.

## Материалы и методы

Для получения фермента навеску листьев проростков гороха (Рамонский 77), выращенных гидропонным методом на свету, растирали со средой выделения (1:4), содержащей 0.1 М фосфатно-цитратный буфер, pH 7.0, 0.4 М сахарозу, 0.01 М фосфат калия. Полученный гомогенат фильтровали через капроновую ткань и центрифугировали. Фракцию клеточных стенок двукратно отмывали 0,1 М фосфатно-цитратным буфером pH 6.0 для выделения адсорбированной на клеточных стенках  $\beta$ -глюкозидазы. Далее ферментный препарат подвергался четырех стадийной очистке. На первом этапе осуществляли фракционирование белков сульфатом аммония (60-100% насыщения) и полученную надосадочную жидкость центрифугировали 40 мин при

3500 g. Для освобождения от низкомолекулярных примесей использовали гель-фильтрацию на колонке с сефадексом G-25 (“Pharmacia”, Швеция), для получения высокоочищенных ферментных препаратов обессоленную белковую фракцию повторно пропускали через колонку с сефадексом G-100. Все операции по выделению и очистке фермента проводили при 4°C.

Чистоту выделенного ферментного препарата контролировали методом электрофореза. Нативный электрофорез в полиакриламидном геле проводили модифицированным методом Девиса. Для определения наличия субъединиц в ферменте осуществляли электрофорез с ДДС-Na в ПААГ по Леммли. Полученные высокоочищенные ферментные препараты  $\beta$ -глюкозидазы далее использовались для определения физико-химических свойств фермента.

*Активность  $\beta$ -глюкозидазы по количеству отщепившейся глюкозы, содержание которой рассчитывали глюкооксидазным методом, в случае р-НФГ – по освобожденному р-нитрофенолу [11].* Для выявления функциональных групп фермента, определили зависимость активности фермента от величины pH. Одновременно рассчитывали величины рК ионогенных групп и теплоту их ионизации, а также определяли скорость фотоинактивации фермента. Все опыты проводили в 3-кратной биологической повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. В работе приведены данные типичных опытов.

## Результаты и обсуждение

В результате проведенной работы был получен ферментный препарат  $\beta$ -глюкозидазы со степенью очистки 56,4 и удельной активностью 338,5 Е/мг белка (таб.1). Нативный электрофорез в системе Девис и Леммли показал его гомогенность. Исследования по изучению влияния pH и температуры на активность данной  $\beta$ -глюкозидазы показали (рис. 1), что температурный оптимум фермента составил +37°C, а pH-оптимум - 4.8. Полученные данные хорошо совпадают с результатами ряда исследователей, которые выделяли  $\beta$ -глюкозидазы из других растений [5].

Как показали результаты нашего эксперимента, с наибольшей скоростью фермент расщеплял специфический для растения гороха природный субстрат ИС-гликозид и с несколько меньшей скоростью синтетический субстрат - р-НФГ. Подобная высокая скорость расщепления ИС-гликозида в клетках растений гороха была ранее показана и для цитоплазматической  $\beta$ -глюкозидазы [9]. Ферментативному гидролизу с участием исследуемого фермента были подвержены также соединения с 1→4, 1→6  $\beta$ -связью, такие как целлобиоза,  $\beta$ -гентиобиоза, УДФ-глюкоза и салицин. Скорость расщепления салицина, имеющего агликон фенольной природы, была самой низкой. Можно предположить, что образующиеся при гидролизе этого соединения фенолы, могут вызывать существенные изменения в обменных процессах клеток, что и отражается на скорости расщепления данного

Таблица 1.

Стадии получения высокоочищенных препаратов адсорбированной на клеточной стенке  $\beta$ -глюкозидазы растений гороха

Стадия очистки	Объем, мл	Общая активность, Е	Общий белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, (%)	Степень очистки, раз
Гомогенат	20	274,2	45,8	6,0	100	1
Фракционирование сульфатом аммония (60-90%)	25	183,7	8,5	21,6	67,0	3,6
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	8	125,4	1,7	73,8	45,7	12,3
Гель-фильтрация на сефадексе G-100	3	67,7	0,2	338,5	24,7	56,4

гликозида.

В присутствии природных и синтетических субстратов изменялись и физико-кинетические характеристики фермента, включая  $K_m$  и  $V_{max}$ . Были построены графики зависимости скорости реакций от концентрации субстратов в системе двойных обратных величин по Лану и установлено, что реакции, катализируемые исследуемым ферментом, относятся к реакции первого порядка и подчиняется закону Михаэлиса-Ментен независимо от используемого субстрата, на что указывали и величины  $K_m$ . Нужно отметить при этом, что наименьшее значение величина  $K_m$  составила для ИС-гликозида (0,32 мМ), тогда как для р-НФГ эта величина была почти втрое выше (табл. 2). Анализ построенных графиков зависимости активности фермента от величины рН среды позволил определить значения рК ионогенных групп фермента, участвующих в акте катализа. Они были соответственно равны для рК<sub>1</sub> 4,4 и рК<sub>2</sub> 5,4 (рис. 2). Рассчитанные по уравнению Вант-Гоффа величины теплот ионизации ( $\Delta H$ ) реакции составили 5,6 кДж·моль<sup>-1</sup> и 39,5 кДж·моль<sup>-1</sup>, что подтвердило присутствие в активном центре фермента карбоксильной группы глутаминовой или аспарагиновой кислот, а так-

же имидазольной группы гистидина. Так как Специфическим реагентом на имидазольную группу гистидина является диэтилпиноксикарбонат (ДЭПК) [12], то внесение его в реакционную среду фермента (10<sup>-6</sup>М) приводило к снижению активности на 80% за счет развития реакции между имидазольной группой  $\beta$ -глюкозидазы и ДЭПК, ведущей к образованию N-этоксиформил имидазола. Типичной реакцией на имидазольную группу гистидина является также ее фотоокисление в присутствии метиленового синего (рис. 3). Как известно, фотоокислению подвергается не только имидазольная группа гистидина, но и фенольная группа тирозина и индольная группа триптофана. Однако, в отличие от последних, скорость фотоокисления имидазольной группы зависит от рН среды.

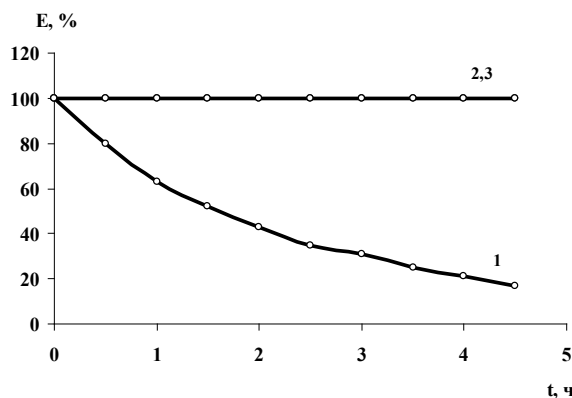
#### Заключение

С помощью разработанной нами системы очистки был получен электрофоретически гомогенный препарат адсорбированной на клеточной стенке  $\beta$ -глюкозидазы. Электрофорез с SDS-На исследуемой формы фермента показал, что это мономер. Фермент катализировал расщепление  $\beta$  1-4 и 1-6 связи в арилглюкопиранозидах и дисахаридах. При этом было установлено, что если

Таблица 2.

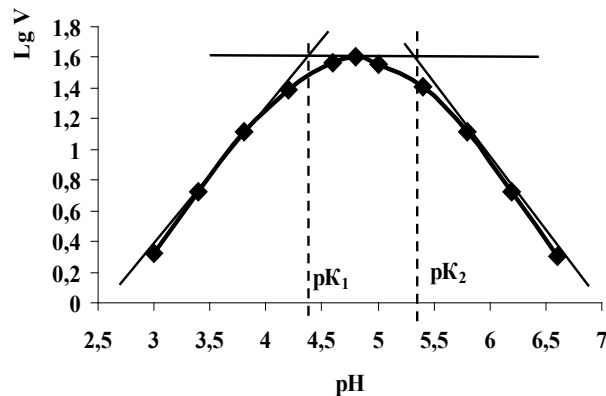
Кинетические характеристики связанной с клеточной стенкой  $\beta$ -глюкозидазы растений гороха

Субстрат	$K_m$ , мМ	$V_{max}$ , мкМ/мин
р-НФГ	0,82	32,27
ИС-гликозид	0,32	41,28
Салицин	4,17	5,28
В-гентиобиоза	3,14	16,15
Целлобиоза	3,28	18,74
УДФ-глюкоза	2,39	13,43



**Рис.2.** Влияние pH на активность  $\beta$ -глюкозидазы проростков гороха при 40°C; V - скорость реакции;  $pK_1$  и  $pK_2$  – константы ионизации активных групп каталитического центра фермента для восходящей и нисходящей ветвей кривой соответственно.

агликоновая часть субстрата была представлена производными фенола, то активность фермента резко снижалась. Показано, что реакция катализируемая  $\beta$ -глюкозидазой является реакцией первого порядка и подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен. Рассчитанные кинетические параметры  $K_m$  и  $V_{max}$  по отношению к разным субстратам показали, что с наибольшей скоростью  $\beta$ -глюкозидаза расщепления специфический ИС-гликозидид и р-НФГ. Проведенные нами расчеты величин  $pK$  и теплот ионизации ( $\Delta H$ ) ионогенных групп  $\beta$ -глюкозидазы указывали на присутствие в активном центре  $\beta$ -глюкозидазы карбоксильной группы глутаминовой либо аспарагиновой кислот и имидазольная группа гистидина, которые участвуют в расщеплении



**Рис. 3.** Скорость инактивация  $\beta$ -глюкозидазы фотоокислением метиленовым синим на свету при pH 4.8 и 25°C (1), без метиленового синего на свету (2), с метиленовым синим в темноте (3).

глюкозидной связи. Дополнительные исследования по фотоинактивации фермента в присутствии ДЭПК подтвердили наличие имидазольной группы гистидина в активном центре  $\beta$ -глюкозидазы растений гороха.

Полученные нами результаты по изучению физико-химических свойств  $\beta$ -глюкозидазы расширяют наше представление о путях метаболизма различных гликозидов в растениях. Выяснение механизмов действия фермента имеет не только теоретическое значение, но и практическое в связи с тем, что растительные  $\beta$ -глюкозидазы наряду с бактериальными могут использоваться и в различных биотехнологических процессах с целью получения природных субстратов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Наумов Д.Г. Биохимия / Д.Г. Наумов. - 2011. - Т. 76. - Вып. 6. - С. 764-780.
2. Tu M.V., Zhang X., Kurabi A., Gilkes N., Mabee W., Saddler J. // Biotechnol.
3. Lett. 2006. V. 28. № 3. P. 151-156.
4. Decker, C.H., Visser, J., Schreier, P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 55. P. 157-163,
5. Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка как динамическая система / М.: Наука, 2007. 429 с.
6. Пасешниченко В.А. // Физиология растений. 1995. Т.42. № 5. С. 787-804.
7. Туран Ю. // Биохимия. 2008. Т.73. Вып. 8. С. 1131-1140.
8. Землянухин А.А., Ершова А.Н. // Физиология растений. 1983. Т.30. №2. С. 341-348.
9. Ershova A.N. // Plant physiology and biochemistry. Special issue. 1996. P. 196.
10. Ершова А.Н. Метаболическая адаптация растений к гипоксии и повышенному содержанию диоксида углерода / А.Н. Ершова. - Воронеж.: Воронеж. гос. ун-т, 2007. - 264 с.
11. Ершова А.Н. Сорбционные и хроматографические процессы / А.Н. Ершова, Н.А. Гущина. - 2003. - Т.3. - Вып. 6. - С. 758-766.
12. Ершова А.Н. Сорбционные и хроматографические процессы / А.Н. Ершова, О.Н. Баркалова. - 2009. - Т. 9. - Вып. 5. - С. 714-721.
13. Корнеева О.С. Биохимия / О.С. Корнеева и др. - 1998. - Т.63. - Вып. 10. - С. 1433-1438.