

УДК 577.154.31

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ИНГИБИРОВАНИЯ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ АЛЬБУМИНАМИ ЧЕЧЕВИЦЫ *LENS ESCULENTA* МЕТОДОМ ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ (ИКС)

© 2005 г. Т.А. Ковалева, Н.В. Николаева, О.М. Кожокина, В.Ф. Селеменев, Т.Б. Образцова, М.Г. Холявка

Воронежский государственный университет

Изучены физико-химические свойства и особенности вторичной структуры глюкоамилазы из *Asp. awamori* 466 в нативном состоянии и в присутствии альбуминов. Установлено ингибирующее воздействие альбуминов на данный фермент. Выявлено, что взаимодействие растительных альбуминов с молекулой глюкоамилазы осуществляется, вероятно, путем комплексообразования, причем остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот играют роль инициаторов образования водородных связей между ферментом и ингибитором.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время заслуживает особое внимание исследование структурно-функциональных свойств глюкоамилазы в присутствии природных ингибиторов и активаторов фермента, представляющих собой системы регуляции, контроля и защиты клетки. Интерес к специфическим белковым ингибиторам из растений, действующим на амилазы микроорганизмов, в значительной мере связан с той важной ролью, которую эти белки могут играть в защите растения от поражения фитопатогенными микроорганизмами. Белки-ингибиторы протеаз и амилаз составляют особую группу соединений, общим свойством которых является способность образовывать с ферментом комплексы, стойкие при физиологических условиях рН. В их составе фермент полностью или частично теряет свою каталитическую активность [1]. Большое число белковых ингибиторов амилаз было выделено преимущественно из растений, представителей семейств злаковых, бобовых и пасленовых.

Ранее было показано ингибирующее воздействие альбуминовых фракций чечевицы *Lens esculenta* на ферментативный гидролиз крахмала [2].

Известно, что метод абсорбционной инфракрасной спектроскопии позволяет получать ценную информацию о состоянии различных групп молекулы фермента, а также дает возможность изучать молекулярные колебания, связанные с определенными группами атомов и взаимодействия между соседними хромофорами [3, 4]. Именно поэтому ИК спектроскопия была использована нами для дальнейшего изучения механизма влияния растительных аль-

буминов на структурно-функциональные свойства глюкоамилазы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служил фермент глюкоамилаза (α -1,4:1,6-глюкан-4,6-глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3 [5]) препарата Глюкоаваморин ГЗХ из *Aspergillus awamori* 466 производства Ладыжинского завода ферментных препаратов, дополнительно очищенный методом гель-хроматографии на сефадексе G-200.

Альбуминовые фракции получали методом многоступенчатой экстракции из *Lens esculenta* [6], очистку осуществляли на сефадексе G-75. Контроль гомогенности глюкоамилазы и альбуминовых фракций проводили путем электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Девиса [7]. Каталитическую активность глюкоамилазы определяли глюкозооксидазным методом реагентами "Glucose "E-D" ("OLVEX DIAGNOSTICUM", Россия).

В качестве субстрата применяли крахмал. Содержание белка в препарате определяли по методу Лоури.

Регистрацию ИК-спектров поглощения производили на спектрофотометре ИКС-14А в диапазоне 4000–400 см⁻¹. Для анализа использовали таблетки, приготовленные методом прессования с избытком КВг, предварительно высушенным при 150°C в течение 24 часов. Масса наполнителя составляла 150 мг, исследуемого образца – 1,5 мг. Смесь КВг и изучаемого препарата подвергали измельчению на вибраторе фон Ардена в течение 4 минут. Полученную порошкообразную массу (100мг) использовали для приготовления таблетки. Далее осуществляли вакуумирование препарата в пресс-форме под давлением 150 кг/см².

Обработку результатов проводили с помощью пакета математической статистики и анализа Mat Cad 2000 Professional на персональном компьютере типа IBM PC.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что альбумины – ингибиторы, действующие по смешанному типу с константой ингибирования $K_i = 3.1 \cdot 10^{-8}$ моль/л [2].

Для выяснения особенностей ингибирования нами были сняты ИК-спектры предварительно очищенных глюкоамилазы из *Asp. awamori* 466, альбуминов чечевицы *Lens esculenta*, а также фермента в присутствии ингибиторов. ИК-спектр глюкоамилазы представлен следующими максимумами поглощения (рис. 1).

Наличие в спектре глюкоамилазы полосы поглощения $3430-3450$ см^{-1} (амид I) вызвано валентными колебаниями NH-групп белка. Известно, что эта группа в пептидном звене в связанном состоянии дает обычно две полосы, а иногда и большее число полос в области $3450-3000$ см^{-1} . Мы также наблюдали несколько пиков поглощения в этой области – максимумы поглощения при 3340 и 3306 см^{-1} .

На наличие асимметричных колебаний карбоксильных групп указывает полоса поглощения при 2520 см^{-1} , а ряд пиков в области $1720-1872$ см^{-1} обусловлены колебаниями карбонильных групп в концевых ассоциированных COOH-группах.

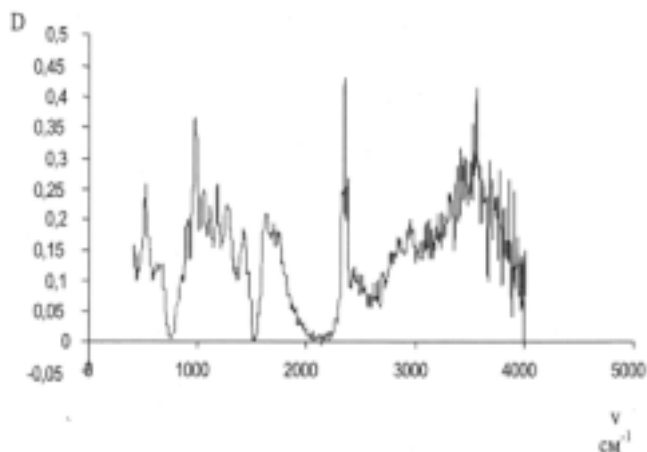


Рис. 1. ИК-спектр нативной глюкоамилазы

Происхождение полос поглощения при 2865 см^{-1} , 2850 см^{-1} , 2815 см^{-1} можно объяснить симметричными колебаниями метильных групп, при 1716 см^{-1} – растяжением связей в группах CO и COOH, а в интервале $1619-1699$ см^{-1} (амид I) – увеличением длины связи в карбонильной группе. В этой области нами были зарегистрированы следующие максимумы: 1670 см^{-1} , который соответствует колебаниям пептидных групп неупорядоченных участков молекулы фермента; 1619 и 1685 см^{-1} – колебательным переходам пептидных групп тех участков молекулы, которые находятся в β -конформации, а 1646 см^{-1} – в α -спирали.

Поглощение в области $1530-1565$ см^{-1} (амид II) свидетельствует об одинаковом положении во вторичной структуре фермента α -спиралей и β -слоев. Колебания, порождающие ее, связаны с растяжением CN-связи и деформацией NH-связи. Наличие водородной связи облегчает смещение кислорода карбонильной группы в направлении донора протона и азота амидной группы в сторону акцептора. Поэтому полоса амид II смещается в область более высоких энергетических уровней. В этом интервале наблюдали следующие максимумы: 1527 см^{-1} – соответствует колебаниям пептидных связей участков молекулы, находящихся в β -конформации, 1542 см^{-1} – неупорядоченным участкам молекулы белка и 1558 см^{-1} – колебаниям пептидных групп в α -спиралях.

Информацию о состоянии вторичной структуры белковой молекулы могут давать полосы амид I и амид II, но наиболее эффективно использовать полосу амид I [4].

В табл. 1 представлены результаты расчетов параметров нормальных колебаний, выполненных для α -спиралей и β -слоев, неупорядоченных структур по изменению максимумов поглощения полосы амид I.

Анализ результатов, представленных в табл. 1, показал, что во вторичной структуре глюкоамилазы из *Aspergillus awamori* 466 преобладают β -конформации, что подтверждает высокую термостабильность и кислотоустойчивость данного фермента.

На ИК-спектре альбумина I ($M_r = 36.2$ кДа) (рис. 2) регистрировали поглощение в области 1041 см^{-1} , связанное с поворотом угла CNH пептидной связи, и отдельный пик при 1168 см^{-1} , который обусловлен

Таблица 1

Содержание типов вторичной структуры нативной глюкоамилазы из *Aspergillus awamori* 466

Конформация	Амид I		
	ν , см^{-1}	D	%
Неупорядоченная структура	1670	0.101	21
	1619	0.127	11
β -конформация	1685	0.107	49
	1646	0.130	14

Содержание типов вторичной структуры альбумина I и альбумина II

Конформация	Альбумин I			Альбумин II		
	Амид I					
	ν , cm^{-1}	D	%	ν , cm^{-1}	D	%
Неупорядоченная структура	1670	0.262	23	1670	0.248	28
β -конформация	1616	0.289	12	1623	0.280	9
	1685	0.349	54	1685	0.319	48
α -спирали	1646	0.304	11	1650	0.289	15

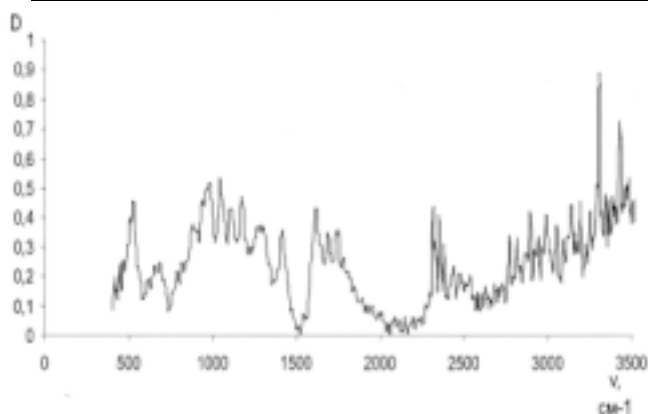


Рис. 2. ИК-спектр альбумина I

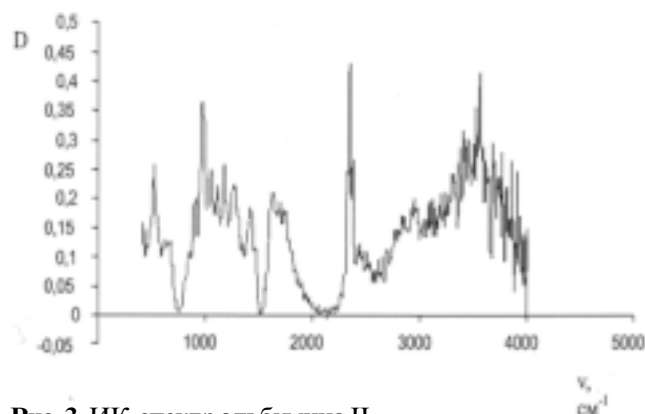


Рис. 3. ИК-спектр альбумина II

скелетными колебаниями. Максимум поглощения в области 1616 cm^{-1} определяется колебаниями связей в β -конформациях, а при 2314 cm^{-1} – симметричными колебаниями метильных групп. Поглощение в области 3305 cm^{-1} появляется вследствие колебаний NH-групп, ассоциированных водородными связями, а отдельный пик при 3428 cm^{-1} свидетельствует о свободных колебаниях NH-групп.

Наличие пиков поглощения на ИК-спектрах альбуминов II ($M_r = 12.1 \text{ кДа}$) (рис. 3) при 2372 и 2850 cm^{-1} соответствует симметричным колебаниям метильных групп. На осуществление свободных колебаний NH-групп указывают полосы поглощения 3440 и 3513 cm^{-1} , а пик 3332 cm^{-1} обусловлен колебаниями NH-групп, ассоциированных водородными связями. Максимумы поглощения при 1604 и 1623 cm^{-1} соответствуют колебаниям пептидных связей в β -конформациях молекулы белка.

Анализ ИК-спектров альбуминовых фракций (полосы поглощения амид I) позволил рассчитать соотношение упорядоченных и неупорядоченных участков вторичной структуры белковых молекул (табл. 2). Выявлено, что альбумин I и альбумин II характеризуются преобладанием β -конформаций (57 - 64% соответственно) во II структуре, неупорядоченные участки составляют 23% и 28% , что подтверждается данными литературы. Известно, что ингибиторы протеиназ и амилаз из растений семейства бобовых характеризуются низким содержанием или полным отсутствием α -спи-

ральных участков. Так, Мосолов В.В. показал, что белковый ингибитор из картофеля характеризовался отсутствием α -спиральных участков, а содержание β -конформаций составляло 30% [1].

На ИК-спектре глюкоамилазы, инкубированной с альбумином I (рис. 4), наблюдали усиление интенсивности поглощения в области 1716 cm^{-1} и сдвиг полосы поглощения с 3440 cm^{-1} (спектр нативной глюкоамилазы) до 3428 cm^{-1} . Эти данные могут свидетельствовать о частичной ионизации группировок COOH и о возникновении внутри- и межмолекулярных связей между первичными и вторичными аминогруппами альбумина I и глюкоамилазы. По-видимому, процесс комплексообразования происходит в области карбоксильных и метильных групп, которые инициируют образование водородных связей.

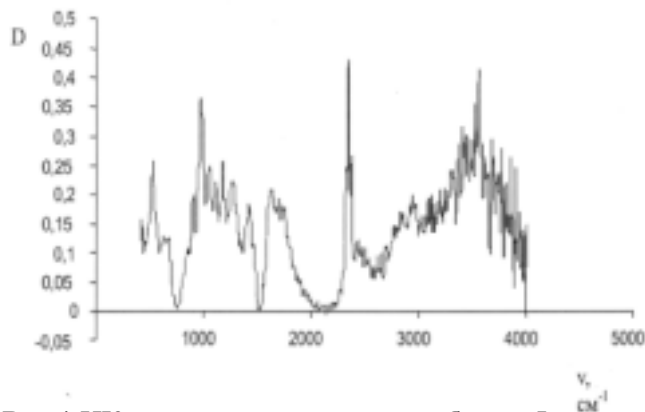


Рис. 4. ИК-спектр глюкоамилазы и альбумина I

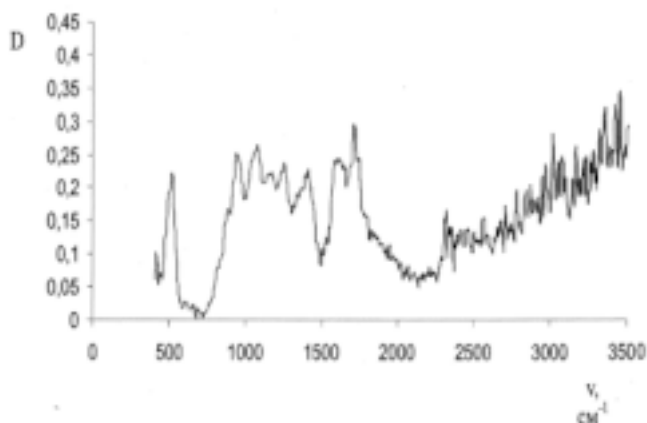


Рис. 5. ИК-спектр глюкоамилазы и альбумина II

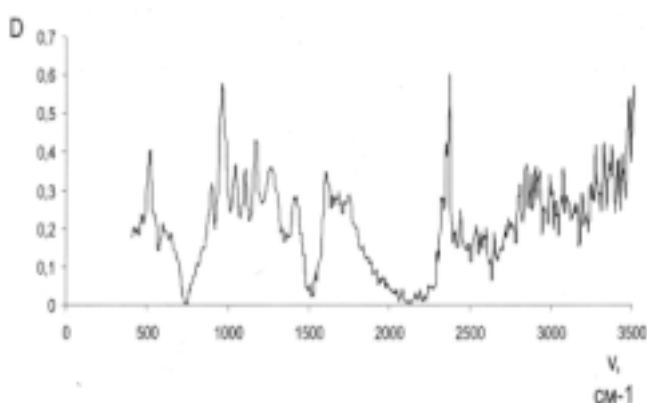


Рис. 6. ИК-спектр смеси глюкоамилазы, первой и второй фракции альбуминов

В ИК-спектре глюкоамилазы и альбумина II имели место аналогичные изменения, как при взаимодействии с альбумином I (рис. 5).

ИК-спектр смеси глюкоамилазы при взаимодействии альбумина I и альбумина II (рис. 6) имеет следующие особенности: появление дополнительной полосы поглощения в области 3417 см^{-1} , уширение полосы поглощения в области $1700\text{--}1820\text{ см}^{-1}$, которое может указывать на изменение в состоянии карбоксильных и метильных белков. Значительное расширение полосы поглощения происходит в области $1689\text{--}1450\text{ см}^{-1}$, что свидетельствует об изменениях состояния аминокрупп белков.

Таким образом, взаимодействие альбумина фракции I и II с молекулой фермента глюкоамилазы не приводит к нарушениям вторичной структуры, соотношение α -спиралей, β -конформаций и неупорядоченных участков не изменяется. Однако наблюдаемые изменения физико-химических свойств глюкоамилазы и ИК-спектров в присутствии альбуминовых фракций могут свидетельствовать о возникновении внутри- и межмолекулярных связей между первичными и вторичными аминокруппами фермента и белкового изолята чечевицы.

Ранее было показано, что при воздействии альбуминовых фракций чечевицы происходит снижение константы ионизации каталитических групп активного центра глюкоамилазы, представленных карбоксильными группами аспарагиновой и глутаминовой аминокислот ($pK = 3.6$ для нативного фермента и 3.4 – для модифицированного).

Обнаружено, что связывающие функциональные группы характеризуются также некоторым изменением константы по ионизации в присутствии альбуминовой фракции: pK_2 нативной глюкоамилазы составляет 5.5 , под действием модификатора происходит сдвиг значения данного параметра до $pK_2 = 5.7$, что соответствует участию групп триптофана в процессе катализа [2]. Williamson M.P. et. al. показали с помощью метода ядерного магнитного резонанса и ультрафиолетовой спектроскопии, что остатки Trp играют важную роль в крахмалосвязывающем домене глюкоамилазы с молекулами крахмала [10].

Таким образом, исследование зависимости каталитической активности фермента от концентрации субстрата при различных pH среды и анализ ИК-спектров позволяют предположить, это взаимодействие альбумина I и альбумина II с молекулой фермента не приводят к нарушению структуры, т.е. соотношение α -спиралей, β -слоев и неупорядоченных участков не изменяется. Однако наблюдаемые изменения в ИК-спектрах смеси глюкоамилазы и альбуминовых фракций могут свидетельствовать о возникновении внутри- и межмолекулярных связей между первичными и вторичными аминокруппами фермента и ингибитора. Альбумины являются специфическими ингибиторами глюкоамилаз. По данным литературы известно, что глюкоамилаза имеет достаточно протяженный участок сорбции субстрата, состоящий из шести подцентров связывания мономерных глюкозных звеньев. Роль функциональных каталитических групп играют Glu-179, Glu-400, Asp-55. Активный центр расположен в сквозной полости (1.5 нм) и имеет нескомпенсированный отрицательный заряд, причем с одной стороны щели сосредоточены Asp-55 и Glu-179, а с противоположной – Glu-400, Trp-120 и два кластера молекул воды. Молекула субстрата, внедряясь в полость активного центра, перемещает кластер воды из щели в менее полярную среду, что благоприятствует ионизации Glu-179. Выведение молекулы воды освобождает полость активного центра для субстрата [10].

Альбумины приводят к изменению константы ионизации pK_1 аспарагиновой и глутаминовой кислот, осуществляющих гидролиз α -1,4 гликозидных связей в молекуле крахмала, которые, вероятно, выступают в роли инициаторов образования водород-

ных связей между ферментом и ингибитором. Сдвиг pK_2 триптофана, обеспечивающего втягивание молекул субстрата в щель активного центра, может свидетельствовать о влиянии боковых радикалов аминокислотных остатков, как собственного (фермента), так и локального (ингибитора) микроокружения. Кроме того, происходит изменение суммарного отрицательного заряда внутриглобулярного электрического поля активного центра за счет перераспределения аминокислотных остатков, находящихся в микроокружении. В связи с этим, возможно, имеет место уменьшение скорости выведения молекул воды для освобождения щели активного центра молекул субстрата, что приводит к замедлению начала акта катализа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты / В.В. Мосолов. – М.: Наука, 1971. – 414 с.
2. Влияние растительных альбуминов на реакцию гидролиза крахмала глюкоававорином в хлебопекарном производстве / Т.А. Ковалева и др. // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2002. – Т. 2, вып. 2. – С. 185-194.
3. Смит А. Прикладная ИК-спектроскопия / А. Смит. – М.: Мир, 1982. – 328 с.
4. Чиргадзе Ю.Н. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков / Ю.Н. Чиргадзе. – М.: Наука, 1965. – 136 с.
5. Номенклатура ферментов / под ред. А.Е. Браунштейна. – М.: ВИНТИ, 1979. – 320 с.
6. Крылова В.Б. Получение белка чечевицы / В.Б. Крылова // Пищевая пром-сть. – 1992. – №6. – С. 22-23.
7. Землянухин А.А. Большой практикум по физиологии и биохимии растений / А.А. Землянухин – Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 1996. – 188 с.
8. Кантор Ч. Биофизическая химия / Ч. Кантор, П. Шиммель: В 3 т. – М.: Мир, 1984. – Т. 2. – 496 с.
9. Function of conserved tryptophans in *Aspergillus niger* glucoamylase 1 starch binding domain / M.P. Williamson et al. // Biochemistry. – 1997. – V. 36. – P. 7535-7539.
10. Williamson G. O-glycosylation in *Aspergillus glucoamylase*. Conformation and role in binding / G. Williamson, N.J. Belshaw, M.P. Williamson // Biochem. J. – 1992. – V. 282. – P. 423-428.