

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ И CO₂-СРЕДЫ НА ТРАНСГЛИКОЗИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ И СВЯЗАННЫХ С КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКОЙ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ β-ГЛЮКОЗИДАЗЫ РАСТЕНИЙ ГОРОХА

А. Н. Ершова, О. Н. Баркалова, А. С. Фатуллаева

Воронежский государственный педагогический университет,

Поступила в редакцию 20.05.2011 г.

Аннотация. Установлено наличие трансгликозидазной активности у цитоплазматической и связанных с клеточной стенкой молекулярных форм β-глюкозидазы проростков гороха в присутствии спиртов (этанол, бутанол, пропанол), которая вызывала повышение активности фермента на 15—40 % в зависимости от природы и концентрации спиртов. При действии гипоксии на проростки только бутанол стимулировал трансгликозидазную активность адсорбированной и ионосвязанной с клеточной стенкой молекулярных форм β-глюкозидазы. У растений, экспонированных в CO₂-среде, активность цитоплазматической и адсорбированной на клеточной стенке β-глюкозидазы в присутствии этанола увеличивалась на 10—15 %, а бутанола — на 15—35 % за счет реакций трансгликозилирования. Показано наличие существенных различий цитоплазматической и связанных с клеточной стенкой молекулярных форм β-глюкозидазы растений гороха по физико-химическим свойствам, включая трансгликозидазную активность.

Ключевые слова: β-глюкозидаза, активность, спирты, гипоксия

Abstract. Occurrence of transglycosidase activity in cytoplasmic and cell wall-bounded molecular forms of β-glycosidase of pea seedlings under presence of alcohols (ethanol, butanol, and propanol) which induced an increase of enzyme activity for 15—40% depending on nature and alcohol concentration was detected. During hypoxia effect on seedlings only butanol stimulated transglycosidase activity of adsorbed and ion-bounded to cell wall molecular forms of β-glycosidase. In plants exhibited to CO₂-media the activity of cytoplasmic and adsorbed on cell wall β-glucosidase in presence of ethanol increased for 10—15 % and butanol for 15—35 % by means of transglycosilation. Existence of significant differences of cytoplasmic and cell wall-bounded molecular forms of β-glycosidase in pea plants for physicochemical properties including transglycosidase activity was shown.

Keywords: β-glycosidase, activity, alcohols, hypoxia.

ВВЕДЕНИЕ

В ряде работ было показано, что кроме гидролитического расщепления β-гликозидной связи в алкил- или арилгликозидах β-глюкозидазы (КФ 3.2.1.21) некоторых растений [1] и многих микроорганизмов [2—4] участвуют в реакциях трансгликозилирования, при этом в качестве акцепторов могли выступать как различные спирты, так и олигосахариды.

В проростках гороха ранее [5] было обнаружено, что β-глюкозидаза может быть представлена цитоплазматической и связанной с клеточными стенками молекулярными формами, которые различались по ряду физико-химических свойств, таких как оптимум температуры и pH, специфичностью к природным и синтетическим арилгликозидам и т.д. Установлено, что в акте катализа ци-

топлазматической β-глюкозидазы принимали участие карбоксильная группа глутаминовой или аспарагиновой кислот, а также имидазольная группа гистидина [6]. На высокоочищенных препаратах цитоплазматической β-глюкозидазы было выявлено, что в условиях гипоксического стресса у растений изменялась как активность, так и кинетические характеристики фермента по отношению к расщепляемым гликозидам, такие как K_m и V_{max} [7, 8]. Сдвигался оптимум pH цитоплазматической β-глюкозидазы у растений в этих же условиях с 5,6 до 5,3, а связанной с клеточными стенками адсорбированной и ионосвязанной формы с 4,8 до 4,3 [5].

Известно, что спиртовая ферментация имеет место на первых этапах прорастания семян разных растений из-за слабой проницаемости семенной кожуры, что вызывает образование и накопление не только этанола, но и этил-β-гликозида [9]. При

этом, как считает ряд авторов [10], использование спиртов у растений в анаэробных условиях в качестве субстрата было более предпочтительнее, чем обычного субстрата глюкозы.

Исследовали трансгликозидазную активность у разных молекулярных форм β -глюкозидазы растений гороха, помещенных в условиях гипоксии и CO_2 -среды.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования служили листья 10-дневных проростков гороха (*Pisum sativum*) сорта «Рамонский 77», выращенных гидропонным методом на свету. Проростки растений без корней и семядолей помещали в различные газовые среды: воздух, углекислый газ и азот (коммерческий из баллонов), которые пропускали через затемненные вакуум-эксикаторы со скоростью 25 см³/с [9]. Цитоплазматическую β -глюкозидазу выделяли и очищали по отработанной ранее методике [7]. Связанные с клеточной стенкой молекулярные формы фермента получали экстрагированием фракции клеточных стенок 0,2 М фосфатно-цитратным буфером pH 6,0 (адсорбированная форма) или 1 М NaCl (ионосвязанная форма). Дальнейшая очистка всех форм β -глюкозидаз включала высаливание сульфатом аммония и гель-хроматографию на G-25. Активность фермента определяли с р-НФГ по количеству отщепившегося р-нитрофенола. За единицу активности (Е) фермента принимали то его количество, которое катализировало расщепление 1 мкмоль субстрата в 1 мин при 37 °С и рассчитывали на мг белка по Лоури или спектрофотометрически при 260 нм (СФ-56, Россия). При изучении трансгликозидазной активности молекулярных форм фермента в реакционную среду в качестве акцепторов вносили этанол, бутанол, пропанол в концентрации 0,5—2,5 М. Эксперименты проводились в двух повторностях. Приведены результаты из серии типичных опытов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При выделении и очистке β -глюкозидазы растений гороха были получены ферментативные препараты β -глюкозидазы. Для цитоплазматической формы фермента степень очистки составляла 16,7 и удельной активностью 198,5 Е/мг белка, для адсорбированной — 20,9 и удельной активности 266 Е/мг белка, ионосвязанной — 7,2 и удельной активностью 113,7 Е/мг белка. Скорость реакции трансгликозилирования оценивали, сравнивая активность β -глюкозидазы в реакционной среде без

спиртов и в их присутствии. Показано [3], что спирты как более сильные нуклеофилы, чем вода, вступают в реакции трансгликозилирования, вызывая увеличение темпов расщепления гликозидов, и это позволяет оценить скорость данных реакций. В случае изменения концентраций спирта и условий реакции (рН, температуры) можно ожидать более эффективного образования соответствующих алкилгликозидов [2]. В наших опытах у растений наблюдалась активация ферментов в зависимости как от концентрации спиртов, так и от длины алкильной цепи только для адсорбированной и ионосвязанной с клеточной стенкой формами фермента. При этом максимальная активность связанных с клеточной стенкой молекулярных форм фермента была выявлена в присутствии 2,5 М бутанола и составляла 117% и 116% соответственно. При тех же концентрациях этанол и пропанол не изменяли активности. В тоже время, в опытах наблюдали увеличение активности цитоплазматической β -глюкозидазы в присутствии пропанола на 40% при его концентрации в среде 0,5 М. Этанол в той же концентрации повышал активность фермента лишь на 30% (рис. 1). Однако, с увеличением концентрации этанола до 2,0—2,5 М активность цитоплазматической β -глюкозидазы, наоборот, снижалась. Бутанол не вызывал изменения скорости гидролиза р-НФГ при всех концентрациях в реакционной среде. Увеличение активности связанной с клеточными стенками β -глюкозидазы ранее наблюдали для растений миндаля и риса в присутствии различных олигосахаридов в концентрации 0,5—2,0 М [3]. Для цитоплазматической формы фермента трансгликозидазная активность наблюдалась в присутствии глицерола [2].

Обнаружено, что при действии гипоксии на растения трансгликозидазная активность цитоплазматической β -глюкозидазы не проявлялась при внесении всех используемых спиртов в реакционную среду. В тоже время для адсорбированной формы в присутствии 2,5 М бутанола наблюдалось повышение активности фермента на 20%, а для ионосвязанной с клеточной стенкой формы фермента даже на 30%, что свидетельствует о проявлении трансгликозидазной активности ферментов. Этанол и пропанол в этом случае практически не оказывали влияния на активность данных молекулярных форм фермента (табл. 1).

При действии CO_2 -среды, которая усиливает все эффекты гипоксии на структуру и функционирование мембран, активность ферментов цикла Кребса и ГАМК-шунта, глиоксилатного пути у

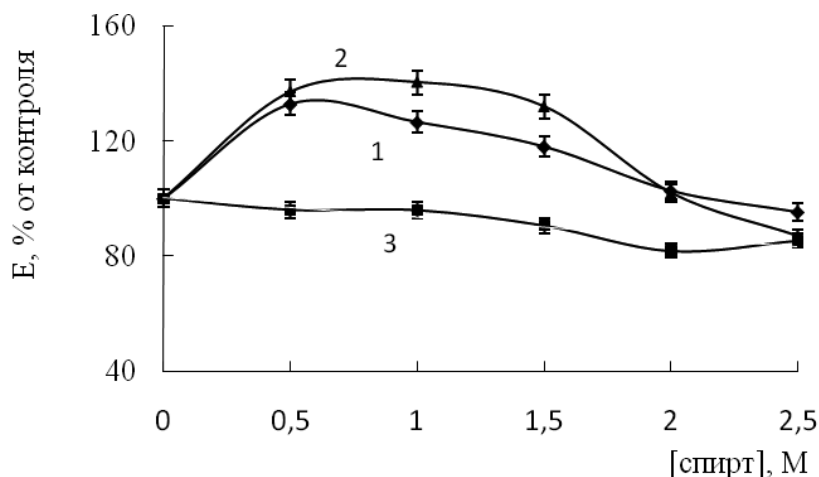


Рис. 1. Скорость трансгликозидазной реакции цитоплазматической β -глюкозидазы растений гороха при использовании разных спиртов в качестве акцептора (1-этанол, 2-пропанол, 3-бутанол)

растений [9], активность всех молекулярных форм фермента не изменялась в присутствии в реакционной среде пропанола. Однако, при действии этанола в концентрации 0,5 М активность цитоплазматической β -глюкозидазы увеличивалась на 10%, а при 2,5 М этого спирта активность связанной с клеточными стенками молекулярных форм возрастала на 15%. В присутствии же бутанола (табл. 1) активность цитоплазматической β -глюкозидазы увеличивалась на 15%, а связанной с клеточными стенками еще более значительно и для адсорбированной формы составило 135%, а ионносвязанной — 125% от контроля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований было показано, что β -глюкозидаза растений гороха наряду с гликозидазной проявляла трансгликозидазную ак-

тивность в присутствии спиртов этанола, бутанола, пропанола как акцепторов, что приводило к накоплению соответствующих алкилгликозидов. Однако эффективность реакций трансгликозидирования зависела от концентрации используемых акцепторов. Показано, что для связанной с клеточной стенкой молекулярных форм β -глюкозидаз четко проявлялась зависимость трансгликозидазной активности ферментов от длины алкильной цепи исследуемых спиртов и их концентрации. Она изменялась также, если ферментные препараты выделялись из растений гороха, подвергнутых воздействию гипоксии и CO_2 -среды. Трансгликозидазная активность фермента растений, находящихся в условиях гипоксии у цитоплазматической формы не проявлялась, а у клеточносвязанных форм она обнаруживалась только в присутствии бутанола. В тоже время при действии CO_2 -среды на растения трансгликозидаз-

Таблица 1

Влияние спиртов на активность цитоплазматической (Glu I) и связанных с клеточной стенкой адсорбированной (Glu II), ионносвязанной (Glu III) молекулярных форм β -глюкозидазы проростков гороха в условиях разных газовых сред (a — воздух, b — гипоксия, c — CO_2 -среда; при концентрации спирта 0,5* и 2,5 М, % — от контроля в отсутствии спиртов)

Спирты	Молекулярные формы β -глюкозидазы								
	Glu I			Glu II			Glu III		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Этанол	132,8*	87,6*	111,4*	101,7	104,5	114,0	114,7	108,7	105,4
Пропанол	140,4*	99,1*	88,6*	98,3	100	106,0	103,9	105,5	96,8
Бутанол	85,5	99,1	116,4	116,5	122,7	134,0	115,9	130	125,0

ная активность проявлялась как в присутствии этанола, так и бутанола, но при разных концентрациях спиртов для цитоплазматической и связанной с клеточными стенками молекулярных форм β-глюкозидазы. Это еще раз подтверждает наличие существенных различий цитоплазматической и связанных с клеточной стенкой молекулярных форм β-глюкозидазы растений гороха по физико-химическим свойствам, включая трансгликозидазную активность по отношению к низкомолекулярным спиртам. Предполагается, что способность к вторичной метаболизации гликозидов является одной из важнейших сторон механизма адаптации растений к недостатку кислорода, который и сопровождался дефицитом субстратов дыхания [10].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Takashi A.* A cell wall-bound β-glucosidase from germinated rice: purification and properties / A. Takashi, K. Nanae // *Phytochemistry*. — 1998. — Vol. 48. — P. 49—54.
2. β-Glycosidase from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*: Structure and Activity in the Presence of Alcohols / D. Sabato [et al.] // *J. Biochem.* — 1999. — Vol. 126, №3 — P. 545—552.
3. *Santosh T. R.* Enhancement of β-Glucosidase and β-Galactosidase of *Trigonella foenum-graecum* by Exposure to the Allelochemical Mimosine / T. R. Santosh, K. K. Balasubramanian, K. Lalitha // *J. Agric. Food Chem.* — 1999. — Vol. 47, № 1. — P. 462—467.
4. *Беккер Е. Г.* Реакции трансгликозилирования, катализируемые β-глюкозидазой из *Aspergillus japonicus* в присутствии модельных соединений лигнина // *Е. Г. Беккер, А. В. Гусаков, А. П. Синицын* // *Прикладная биохимия и микробиология*. — 1991. — Вып. 4. — Т. 27. — С. 482—485.
5. *Ершова А. Н.* Физико-химические и кинетические свойства клеточносвязанных молекулярных форм β-глюкозидазы проростков гороха / А. Н. Ершова, Н. А. Еремина // *Теория и практика сорбционных процессов: сб. науч. тр. ВГ У.* — Воронеж, 2005. — С. 356—364.
6. *Ершова А. Н.* Идентификация каталитически активных групп β-глюкозидазы растений гороха (*Pisum sativum*) / А. Н. Ершова, О. Н. Баркалова // *Прикладная биохимия и микробиология*. — 2011. — № 3, Т.47. — С. 259—264.
7. *Ершова А. Н.* Выделение, хроматографическая очистка и свойства β-глюкозидазы растений гороха, подвергнутых воздействию гипоксии и CO₂-среды / А. Н. Ершова, О. Н. Баркалова // *Сорбционные и хроматографические процессы*. — 2009. — Т. 9, Вып.5. — С. 714—721.
8. *Баркалова О. Н.* Изучение кинетических характеристик β-глюкозидазы растений гороха при действии гипоксического стресса / О. Н. Баркалова, А. Н. Ершова // *13-я Пушкинская школа-конференция молодых ученых: Биология науки XX I века, Пушкино, 2009*. — С. 59—60.
9. *Ершова А. Н.* Метаболическая адаптация растений к гипоксии и повышенному содержанию диоксида углерода / А. Н. Ершова. — Воронеж: ВГ У, 2007. — 264 с.
10. *Чиркова Т. В.* Пути адаптации растений к гипоксии и аноксии / Т. В. Чиркова. — Л.: ЛГУ, 1988. — 243 с.

Ершова Антонина Николаевна — заведующая кафедрой биологии растений и микробиологии, д.б.н., профессор, Воронежский государственный педагогический университет; e-mail: aershova@vspu.ac.ru

Ershova Antonina N. — chief of biology of plant and microbiology department, doctor of biology science, professor, Voronezh State Pedagogical University; e-mail: aershova@vspu.ac.ru

Баркалова Оксана Николаевна — аспирант 3 года обучения кафедры биологии растений и микробиологии Воронежский государственный педагогический университет; e-mail: oks-bar@mail.ru, тел.: (951) 552-4898

Barkalova Oksana N. — post-graduate student of biology of plant and microbiology department Voronezh State Pedagogical University; e-mail: oks-bar@mail.ru, tel.: (951) 552-4898

Фатullaева Айнур Садулла кызы — аспирант 1 года обучения кафедры биологии растений и микробиологии, Воронежский государственный педагогический университет; e-mail: Aynur_fatullaeva@mail.ru, тел.: (920) 460-8344

Fatullaeva Aynur Sadulla kizi — post-graduate student of biology of plant and microbiology department, Voronezh State Pedagogical University; e-mail: Aynur_fatullaeva@mail.ru, tel.: (920) 460-8344