

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ И СВЯЗАННОЙ
С КЛЕТОЧНЫМИ СТЕНКАМИ В-ГЛЮКОЗИДАЗЫ
РАСТЕНИЙ ГОРОХА****А. Н. Ершова, О. Н. Баркалова, А. С. Фатуллаева***ФГБОУ ВО «Воронежский государственный педагогический университет»*

Поступила в редакцию 02.02.2017 г.

Аннотация. Получены электрофоретически гомогенные препараты цитоплазматической и связанной с клеточными стенками β -глюкозидазы (КФ. 3.2.1.21), растений гороха. Методом SDS-электрофореза показано, что обе молекулярные формы фермента являлись мономерами с молекулярной массой 63 кДа и 30.9 кДа. Они отличались электрофоретической подвижностью, термостабильностью и устойчивостью к низким значениям pH. Обе формы с наибольшей скоростью гидролизывали β -гликозидные связи в специфическом для растений гороха изосукцинимид- β -D-глюкозиде (K_m 0.58 мМ и 0.74 мМ), но при этом могли расщеплять салицин, целлобиозу, ламинарин, но не α - и β -D-галактопиранозиды.

Ключевые слова: β -глюкозидаза, горох, цитоплазматическая, связанная с клеточной стенкой, очистка, молекулярная масса, субстратная специфичность, константа Михаэлиса, термо- и кислото-стабильность.

Abstract. Electrophoretically homogeneous specimens of cytoplasmic and cell-wall bound β -glucosidase (EC 3.2.1.21) of pea plants were obtained. By SDS-electrophoresis was shown that two molecular forms of enzyme appeared to be monomers with molecular mass 63 kDa and 30.9 kDa. They were different by electrophoretic mobility, thermostability and tolerance to low pH. Both forms hydrolyzed β -glycosidic bonds under maximum speed in pea plants specific isosuccinimide- β -D-glycoside (K_m 0.58 mM and 0.74 mM), but with that were able to cleave salicin, cellobiose, laminarin but not α - and β -D-galactopyranosides.

Keywords: β -glucosidase, pea, cytoplasmic, cell-wall bound, purification, molecular weight, substrate specificity, the Michaelis constant, thermo- and acid stability.

β -Глюкозидазы (КФ. 3.2.1.21), относятся к классу гидроксил-гидролаз и участвуют в реакциях расщепления β -гликозидной связи в различных олиго-, алкил- и арилглюкозидах [1]. При классификации β -глюкозидаз обычно учитывается природа агликона расщепляемых ими субстратов. Однако многие β -глюкозидазы могут обладать широкой субстратной специфичностью, что затрудняет их отнесение к определенным семействам этого класса. β -Глюкозидазы участвуют в гидролизе гликолипидов, превращении цианогенных гликозидов и сапонинов, алкалоидов, флавоноидов [2], в проявлении активности фитогор-

монов, в процессах лигнификации и деградации клеточных стенок [3]. В тоже время некоторые растительные β -глюкозидазы обладают высокой специфичностью к расщепляемым субстратам, что отражается в их названии. β -Глюкозидазы имеют различную клеточную локализацию и их можно обнаружить в вакуолях, цитоплазме хлоропластах растительных клеток. При этом целый ряд β -глюкозидаз могут находиться в связанном с клеточной стенкой состоянии [4].

В проростках гороха ранее был обнаружен специфический гликозид, идентифицированный как изосукцинимид- β -гликозид [5] в метаболизации которого, как показали наши опыты, при-

нимают участие, как минимум две молекулярные формы β -глюкозидазы, цитоплазматическая и связанная с клеточной стенкой [6]. В тоже время известно [7], что ферменты, связанные с клеточной стенкой, обычно значительно отличаются от цитоплазматических форм по своим физико-химическим параметрам. На данный момент исследованы свойства лишь незначительного количества растительных β -глюкозидаз различной клеточной локализации [8]

В связи с этим целью работы явилось получение высокоочищенных препаратов цитоплазматической и связанной с клеточной стенкой β -глюкозидазы растений гороха и изучение их физико-химических свойств, включая электрофоретическую подвижность, субстратную специфичность, термо- и кислотоустойчивость, а также ряда кинетических параметров.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования служили листья 10-дневных растений гороха сорта Рамонский 77, выращенных методом гидропоники на свету. Выделение и очистку β -гликозида проводили из листьев проростков, растирая навеску со средой выделения (0.05М фосфатно-цитратный буфер рН 7.0, 0.4 М сахароза и 0.01 М фосфат калия). Гомогенат пропускали через капроновую ткань и центрифугировали. Полученный супернатант использовали для выделения цитоплазматической β -глюкозидазы [9]. Осадок, содержащий клеточные стенки, дважды промывали 0.2 М фосфатно-цитратным буфером и обрабатывали раствором 1М NaCl в 0.1 М фосфатно-цитратным буфером (рН 4.6) для получения связанной с клеточной стенкой β -глюкозидазы [10]. Для дальнейшей очистки ферментов использовали фракционирование сульфатом аммония (60-90%), гель-фильтрацию на сефадексе G-25 и G-100 ("Pharmacia", Швеция).

Активность β -глюкозидазы определяли спектрофотометрическим методом на СФ-56 («ЛЮМО», Россия). За единицу активности фермента (Е) принимали количество фермента, катализирующего расщепление 1 мкмоль субстрата в 1 мин. Удельную активность выражали в Е/мг белка. Содержание белка в пробах определяли по Лоури или спектрофотометрически.

Нагивный электрофорез проводили в 7.5%-ном ПААГ модифицированным методом Дэвиса. Белок проявляли раствором Кумасси R-250 ("Serva", Германия). Денатурирующий электро-

форез осуществляли по методике Лэммли при концентрации ПААГ 12.5%. В качестве белков метчиков использовали маркерные белки: каталаза – 224 кДа, бычий сывороточный альбумин – 66.6 кДа, пероксидаза - 44.1 кДа, лизоцим - 14.4 кДа ("Sigma", США).

Субстратную специфичность препаратов определяли при внесении в среду инкубации различных субстратов (0.5-10 мМ), активность фермента определяли спектрофотометрически. по количеству отщепившегося р- нитрофенола или по глюкозе, содержание которой рассчитывали глюкооксидазным методом [10]. ИС-гликозид получали методом препаративной бумажной хроматографии [5]. Кинетические параметры K_m и V_{max} выделенных молекулярных форм фермента рассчитывали для всех используемых субстратов методом двойных обратных величин по методу Михаэлиса-Ментена.

Молекулярную массу β -глюкозидаз определяли с использованием гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-100 (1.5×40). Свободный объем колонки определяли с помощью голубого декстрана ("Serva", Германия) и рассчитывали по соответствующим формулам.

Оптимальный рН выделенных форм β -глюкозидазы устанавливали с использованием фосфатно-цитратного буфера при рН 3.0-7.8 и шагом 0.4 в присутствии р-НФГ в качестве субстрата. Для определения рН стабильности предварительно среда инкубации с ферментами выдерживалась 30 мин при значениях рН 3.0-7.8, после чего вносили субстрат р-НФГ и определяли остаточную активность фермента.

Температурный оптимум фермента определяли при оптимальных значениях рН для цитоплазматической формы (рН 5.2) и связанной с клеточной стенкой β -глюкозидазы (4,6) и температурах от +4 до +100°C с шагом 10°C с использованием субстрата р-НФГ. Для определения термостабильности ферментные препараты предварительно в течение 30 мин выдерживали в среде инкубации при различных температурах от +4 до +70°C и после охлаждения в них вносили субстрат для определения остаточной активности фермента.

Опыты проводили в трехкратной биологической и аналитической повторностях. В таблицах и на рисунках приводятся данные типичных опытов, причем каждое значение есть среднее арифметическое из трех определений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенной многостадийной очистки (табл. 1) были получены ферментные препараты цитоплазматической β -глюкозидазы со степенью очистки 80.7 и удельной активностью 1477.7 Е/мг белка и связанной с клеточной стенкой β -глюкозидазы со степенью очистки – 57.9 и удельной активностью 451.7 Е/мг белка. Нативный электрофорез показал, что в результате предложенной нами схемы очистки были получены электрофоретически гомогенные ферментные препараты. Результаты Na-ДДС-ПААГ-электрофореза показали, что цитоплазматическая и связанная с клеточной стенкой β -глюкозидаза являются мономерами, но имеют различную электрофоретическую подвижность. Величина Rf для цитоплазматической β -глюкозидазы составила 0.39, а для связанной с клеточной стенкой - 0,86. Для определения молекулярной массы β -глюкозидазы был использован метод гель-фильтрации с построением калибровочной кривой (рис.1). Расчеты с использованием соответствующих формул показали, что молекулярная масса цитоплазматической β -глюкозидазы составила 63.0 ± 1.4 кДа. Гомогенные препараты цитоплазматической и связанной с клеточной стенкой β -глюкозидазы

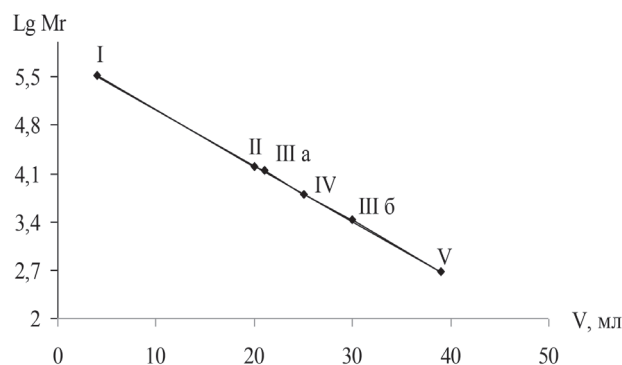


Рис.1. Зависимость логарифма молекулярной массы белка от элюиционного объема при гель-хроматографии на G-100 (I - каталаза, II - альбумин, IIIa – цитоплазматическая β -глюкозидаза, IIIб - связанная с клеточной стенкой β -глюкозидаза, IV - пероксидаза, V- лизоцим).

далее использовали для изучения физико-химических и кинетических свойств. Как показали проведенные опыты (рис. 2, 3), максимальную активность цитоплазматическая β -глюкозидаза проявляла при значениях pH 5.6 и температуре +30°C. В то же время температурный оптимум связанной с клеточной стенкой β -глюкозидазы был выше и составил + 37°C, а оптимум pH был несколько сдвинут в кислую сторону и составил

Таблица 1

Стадии очистки цитоплазматической (а) и связанной с клеточной стенкой (б) β -глюкозидазы растений гороха

Стадии очистки	Общая активность, Е		Общий белок, мг		Удельная активность, Е/мг белка		Выход, %		Степень очистки, раз	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Гомогенат	2612	488.3	167.8	62.6	15.6	7.8	100	100	1	1
Фракционирование сульфатом аммония	2234	367.5	87.4	21.0	25.5	17.5	85.5	75.3	1.6	2.2
Гель-фильтрация на G-25	1595	295.4	24.9	5.5	64.1	53.7	61.1	60.5	4.1	6.9
Гель-фильтрация на G-100	399	90.3	0.3	0.2	1477.7	451.7	16.2	18.5	80.7	57.9

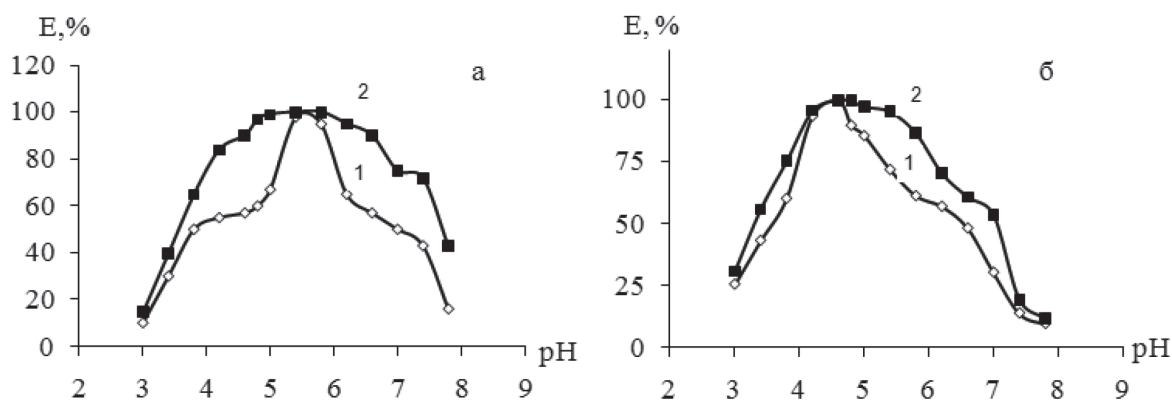


Рис. 2. Влияние pH на активность (1) и стабильность (2) цитоплазматической (а) и связанной с клеточной стенкой (б) β -глюкозидазы растений гороха

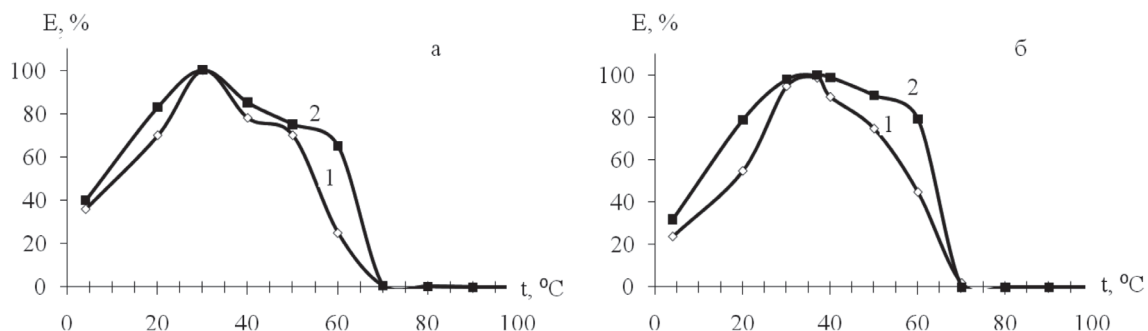


Рис. 3. Влияние температуры на активность (1) и стабильность (2) цитоплазматической (а) и связанной с клеточной стенкой (б) β -глюкозидазы растений гороха

4.6. Термостабильность связанной с клеточной стенкой β -глюкозидазы, оказалась также выше по отношению к цитоплазматической форме и при +65°C сохранялось почти 70% ее активности (рис 3). Как цитоплазматическая, так и связанная с клеточной стенкой β -глюкозидаза растений гороха были достаточно стабильны в интервале рН 4.0-6.0 (рис. 2). В тоже время связанная с клеточной стенкой β -глюкозидаза оказалась более стабильной, чем цитоплазматическая форма, в условиях кислых значений рН. При снижении рН до 3.0 она сохраняла 30% своей активности, тогда как для цитоплазматической формы при данной величине рН остаточная активность составляла лишь 15% первоначальной. Большая термо- и кислотостабильность связанных с клеточной стенкой форм фермента ранее была обнаружена и для β -глюкозидазы других растений. Предполагается, что это может быть результатом стабилизирующего взаимодействия ферментов с функциональными группами веществ клеточных стенок [7].

Одной из важных характеристик ферментов является их субстратная специфичность. Для целого ряда растительных β -глюкозидаз наблюдалась высокая специфичность фермента к агликону, вслед-

ствие чего они были способны расщеплять только определенные соединения, например изофлавоноидные конъюгаты или цианогенные гликозиды [2,8]. В связи с этим была исследована способность полученных высокоочищенных препаратов цитоплазматической и связанной с клеточной стенкой β -глюкозидазы растений гороха расщеплять β -гликозидные связи в различных субстратах. Данные, приведенные в таблице 2 показали, что обе молекулярные формы фермента гидролизовали β -гликозидные связи как в глюкопиранозидах (ИС-глюкозид, р-НФГ, метил- β -D-глюкопиранозид, салицин), так и ди- (β -гентиобиоза, целлобиоза) и полисахаридах (ламинарин), однако с различной скоростью. В то же время ни одна из молекулярных форм β -глюкозидазы не гидролизовала α - и β -D-галактопиранозиды. Такой тип специфичности не так часто встречается у растительных ферментов данного класса.[11]. Например, β -глюкозидазы растений риса и сои обладали строгой специфичностью к сахарному остатку, но расщепляли как α -, так и β -D-глюкопиранозидные связи [2]. Как показали наши опыты с более высокой скоростью обе формы β -глюкозидазы расщепляли специфичный для гороха ИС-гликозид (149 и 140%), по от-

Таблица 2

Активность цитоплазматической (а) и связанной с клеточной стенкой (б) β -глюкозидаз растений гороха по отношению к различным субстратам

Субстрат	Тип связи	Активность, %	
		a	b
р-НФГ (р-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид)	β -(1→6)	100	100
ИС-гликозид (изосукцинимид- β -D-глюкопиранозид)	β -(1→4)	149	140
Целлобиоза (4-O- β -D-глюкопиранозил-D-глюкопираноза)	β -(1→4)	20	63
β -гентиобиоза (6-O- β -D-глюкопиранозил-D-глюкопираноза)	β -(1→6)	4	50
Метил- β -D-глюкопиранозид	β -(1→4)	10	42
Ламинарин	β -(1→6)	-	38
Салицин (салигенин- β -D-глюкопиранозид)	β -(1→6)	19	4
р-НФ- α -Г (р-нитрофенил- α -D-галактопиранозид)	α -(1→6)	0	0
р-НФ- β -Г (р-нитрофенил- β -D-галактопиранозид)	β -(1→6)	0	0

ношению к синтетическому - р-НФГ (100%). В тоже время ферменты из клеток других растений такой активностью по отношению р-НФГ не обладали [11]. Кроме р-НФГ и ИС-гликозида обе формы β -глюкозидазы гороха расщепляли и другие соединения, содержащие 1 \rightarrow 4 и 1 \rightarrow 6 β -глюкозидные связи, такие как целлобиоза, β -гентиобиоза, метил- β -D-глюкопиранозид и ламинарин. Однако скорость гидролиза этих соединений, связанной с клеточной стенкой и цитоплазматической формами β -глюкозидазы, была различна. Полисахарид ламинарин не расщеплялся цитоплазматической формой фермента, но достаточно активно это делала связанная с клеточной стенкой β -глюкозидаза. Скорость расщепления салицина была самой низкой для связанной с клеточной стенкой β -глюкозидазы растений гороха, а для цитоплазматической формы это было характерно в присутствии β -гентиобиозы. Подобные различия в скорости расщепления различных субстратов наблюдались ранее и для других растительных β -глюкозидаз разной клеточной локализации [4,8].

На основе полученных результатов исследования активности обеих форм β -глюкозидазы в присутствии различных субстратов нами были рассчитаны основные кинетические характеристики фермента, такие как K_m и V_{max} (таб. 3). Полученные значения величин K_m показали, что кинетика реакций, катализируемая как цитоплазматической, так и связанной с клеточной стенкой β -глюкозидазы растений гороха, подчинялась закону Михаэлиса-Ментен и это не зависело от типа субстрата. Величина K_m при использовании ИС-гликозида была наименьшей по отношению к другим субстратам и составила для цитоплазматической

формы – 0.58 мМ, а для связанной с клеточной стенкой – 0.74 мМ. Это еще раз подтверждает, что для β -глюкозидазы растений гороха предпочтительным субстратом является специфическое для этого растения соединение ИС-гликозид. Однако β -глюкозидаза растений гороха, в отличие от других растительных β -глюкозидаз, могла достаточно эффективно расщеплять и другие субстраты, включая р-НФГ, целлобиозу, а для цитоплазматической формы и салицин, который часто используется в качестве основного субстрата при определении активности некоторых растительных β -глюкозидаз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью разработанной нами системы очистки были впервые получены электрофоретически гомогенные препараты цитоплазматической (степень очистки 80.7) и связанной с клеточной стенкой (степень очистки 57.9) β -глюкозидазы растений гороха и изучены их физико-химические и кинетические свойства. Как цитоплазматическая, так и связанная с клеточной стенкой β -глюкозидаза проявляли строгую специфичность к агликону и с наибольшей скоростью гидролизовали специфический для растений гороха ИС-гликозид (K_m 0.58 и 0.74 мМ), однако могли расщеплять и другие как арил- и алкилглюкопиранозиды, так и ди- и полисахариды. При этом они обладали абсолютной специфичностью к типу расщепляемой гликозидной связи и расщепляли только 1 \rightarrow 4 и 1 \rightarrow 6 β -D-глюкопиранозидные связи, но не расщепляли α - и β -D-галактопиранозидные в отличие от других глюкозидаз [11]. Полученные результаты указывают на то, что выделенные молекулярные формы β -глюкозидазы гороха обладали абсолютной специфичностью к типу расщепляемой связи (β -конфигурация), но не к агликону. Показано, что обе формы β -глюкозидазы гороха являлись мономерами с молекулярной массой 63 кДа и 30.9 кДа. Хотя многие растительные β -глюкозидазы могут быть представлены ди- или тетрамерами обнаружены и мономерные формы фермента с молекулярной массой 62.4 кДа. и – 33 кДа [9.]

Установлено, что выделенные молекулярные формы β -глюкозидазы отличались также электрофоретической подвижностью, оптимумом рН и температуры, термо- и кислотоустойчивостью. При этом связанная с клеточной стенкой β -глюкозидаза обладала несколько большей, чем цитоплазматическая форма, термостабильностью и устойчивостью в зоне кислых значений рН, Вероятно это связано со взаимодействия этой моле-

Таблица 3

Кинетические характеристики цитоплазматической (а) и связанной с клеточной стенкой (б) β -глюкозидазы растений гороха

Субстрат	K_m , мМ		V_{max} , мкМ/мин	
	а	б	а	б
Арилглюкопиранозиды				
р-НФГ	0.62	0.93	56.1	54.9
ИС-гликозид	0.58	0.74	83.3	72.3
метил- β -D-глюкопиранозид	0.76	1.43	71.5	40.18
Салицин	1.52	4.17	15.2	5.28
Дисахариды				
β -гентиобиоза	5.3	1.24	4.11	43.54
Целлобиоза	1.66	1.28	12.5	42.74
Полисахариды				
Ламинарин	-	1.51	-	39.23

клярной формы фермента с различными функциональными группами веществ клеточных стенок, что и повысило ее устойчивость к различным факторам среды.

Полученные нами данные о свойствах β -глюкозидазы растений гороха разной клеточной локализации расширяют наши представления о роли β -глюкозидаз в метаболизме растений, включая их участие в превращении различных гликозидов, веществ клеточных стенок, а также же возможного использования, наряду другими ферментами, в различных тест-системах по определению устойчивости к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Наумов Д.Г. Иерархическая классификация гликозил-гидролаз / Д.Г.Наумов // Биохимия. — 2011. — Т. 76, Вып. 6. — С. 764–780.
2. Hsieh M.-C. Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates / M.-C. Hsieh, T.L. Graham // Phytochemistry. — 2001. — Vol. 58. — P. 995–1005.
3. Ершова А.Н. Идентификация каталитически активных групп β -глюкозидазы растений гороха (*Pisum sativum*) / А.Н. Ершова, О.Н. Баркалова // Прикладная биохимия и микробиология. — 2011. — Т.47, № 3. — С. 259–264
4. Shah M.A. Strategy for purification of aggregation prone β -glucosidases from the cell wall of yeast: a preparative scale approach / M.A. Shah T.K. C.S. Mishra // New Biotechnology. — 2012. — Vol. 29, № 3. — P. 311–320.
5. Ершова А.Н. Метаболическая адаптация растений к гипоксии и повышенному содержанию диоксида углерода / А.Н.Ершова. — Воронеж : Изд-во Воронеж. ун-та, 2007. — 264 с.
6. Ершова А.Н. Влияние гипоксии и CO_2 -среды на трансгликозидазную активность цитоплазматической и связанных с клеточной стенкой молекулярных форм β -люкозидазы растений гороха / А.Н. Ершова, О.Н. Баркалова, А.С. Фатуллаева // Вестник Воронежского Государственного Университета Серия Химия. Биология. Фармация. — 2011. — №2. — С. 88–91.
7. Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка как динамическая система/ Т.А Горшкова — М: Наука, 2007. — 429 с.
8. Izumi S. Purification and characterization of β -glucosidase from root parasitic plant *Orobancha minor* Sm / S. Izumi, Go H. // Biosci., Biotechnol. and Biochem. — 2010. — V. 74. — P. 646–648.
9. Ершова А.Н. Выделение, хроматографическая очистка и свойства β -глюкозидазы растений гороха, подвергнутых воздействию гипоксии и CO_2 -среды / А.Н.Ершова, О.Н.Баркалова // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2009. — Т.9, № 5. — С. 714–721.
10. Ершова А.Н. Выделение клеточносвязанных форм β -глюкозидазы проростков гороха, их очистка и изменение в онтогенезе / А.Н.Ершова, Н.А.Гущина // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2003. — Т.3, № 6. — С. 758–766.
11. Structural determinants of substrate specificity in family I β -glucosidases. Novel insights from the crystal structure of sorghum dhurrinase-1, a plant β -glucosidase with strict specificity, in complex with its natural substrate / L. Verdoucq [et al.] // J. Biol. Chem. — 2004. — Vol. 279, №30. — P. 31796–31803.

Воронежский государственный педагогический университет

Ершова А. Н., доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой биологии растений и животных

Тел.: +7(473)253 29 86

E-mail: aershova@vspsu.ac.ru

Баркалова Оксана Николаевна, ассистент кафедры биологии растений и животных

Фатуллаева Айнур Садулла кызы, аспирант кафедры биологии растений и животных

Voronezh State Pedagogical University

Ershova Antonina Nikolaevna, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of Plant and Animal Biology Chair

E-mail: aershova@vspsu.ac.ru

Ph.: +7 (473) 253-29-86

Barkalova Oksana Nikolaevna,

Fatullayeva Aynur Sadulla kyzы, аспирант кафедры биологии растений и животных