

УДК 577.152.321

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ГРУПП β -ГЛЮКОЗИДАЗЫ РАСТЕНИЙ ГОРОХА (*Pisum sativum* L.)

© 2011 г. А. Н. Ершова, О. Н. Баркалова

Воронежский государственный педагогический университет, Воронеж, 394043

e-mail: aershova@vspu.ac.ru

Поступила в редакцию 15.04.2010 г.

Идентифицированы функциональные группы цитоплазматической β -глюкозидазы растений гороха, предварительно очищенной до электрофоретически гомогенного состояния. По кривой зависимости активности фермента от pH, рассчитанным величинам теплот ионизации, фотоинактивации фермента в присутствии метиленового синего, а также инактивации фермента диэтилпирикарбонатом установлено, что в каталитическом центре β -глюкозидазы присутствуют карбоксильная группа глутаминовой или аспарагиновой кислот и имидазольная группа гистидина.

Фермент β -глюкозидаза (β -D-глюкозидглюкогидролаза, КФ 3.2.1.21) избирательно катализирует гидролитическое расщепление β -глюкозидной связи между остатками глюкозы, а также между глюкозой и арил- или алкил-агликоном. Имеется достаточно много данных о свойствах и функциях β -глюкозидаз, выделенных из дрожжей, грибов, бактерий [1–3]. Растительные β -глюкозидазы исследованы в меньшей степени. Установлено, что они обычно проявляют максимальную активность при слабокислых значениях pH (4.0–6.0) и в более узком, чем для бактерий, интервале температур (30–50°C) [4–9]. Считают, что механизм действия различных гликозидаз сходен. В процессе катализа участвуют две карбоксильные группы белка-фермента с различной величиной pK_a [4].

В проростках гороха была обнаружена β -глюкозидаза [8], расщепляющая специфический изосукцинимид- β -гликозид, предшественником агликона которого является циклическое производное γ -аминомасляной кислоты. Установлено наличие нескольких молекулярных форм этого фермента, которые различались по ряду свойств [10]. Молекулярная масса цитоплазматической β -глюкозидазы составляет 63 кДа. Фермент был достаточно устойчив в интервале pH 4.6–7.0 и интервале температур 20–45°C. Однако сведения о механизме действия β -глюкозидазы растений гороха так же, как и других растительных β -глюкозидаз, отсутствуют.

Цель работы – выявление функциональных групп β -глюкозидазы растений гороха, которые участвуют в акте катализа, установление зависимости активности фермента от величины pH, расчет величины pK ионогенных групп и теплоты их ионизации, а также определение скорости фотоинактивации фермента.

МЕТОДИКА

Использовали высокоочищенные препараты цитоплазматической β -глюкозидазы, которые получали из листьев 10-суточных проростков гороха (сорт Рамонский 77), выращенного на свету методом гидропоники. Навеску листьев растирали со средой выделения (1 : 4), включающей 0.05 М фосфатно-цитратный буфер, pH 7.0, 0.4 М сахарозу и 0.01 М фосфат калия. Гомогенат отжимали через капроновую ткань и центрифугировали 30 мин при 3500 g для отделения неразрушенных клеток и их крупных фрагментов. Белки осаждали сернокислым аммонием (60–90%). Полученную после высаливания фракцию для удаления низкомолекулярных примесей пропускали через колонку с сефадексом G-25 (1.0 × 30 см), уравновешенную фосфатно-цитратным буфером, pH 5.6, со скоростью 20 мл/ч. Обессоленную белковую фракцию пропускали через колонку с сефадексом G-100 (1.5 × 40 см), предварительно уравновешенную тем же буфером. Скорость элюции составляла 8 мл/ч. Все операции по выделению и очистке фермента проводили при 4°C.

Активность β -глюкозидазы определяли с п-нитрофенил- β -D-глюкопиранозидом (п-НФГ) по количеству отщепившегося п-нитрофенола [5]. Инкубационная смесь содержала 0.2 мл 10 мМ раствора п-НФГ в 50 мМ фосфатно-цитратном буфере, pH 5.6 и 0.1 мл фермента. После инкубации в течение 30 мин при 37°C реакцию останавливали добавлением 0.2 М раствора Na_2CO_3 . Интенсивность окраски измеряли при 440 нм. В контроле фермент отсутствовал. Количество п-нитрофенола рассчитывали, используя коэффициент поглощения $\epsilon_{440} = 2.41 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. За единицу активности (Е) β -глюкозидазы принимали количество фермента, катализирующего расщепление 1 мкмоль субстрата в 1 мин при 37°C. Удельную

Таблица 1. Стадии очистки β -глюкозидазы проростков гороха

Стадия очистки	Количество белка, мг	Активность, Е	Удельная активность, Е мг ⁻¹	Выход, %	Степень очистки, раз
Гомогенат	167.8	2610	15.6	100	1
Высаливание сульфатом аммония, 60–90%	87.4	2230	25.5	85.5	1.6
Гель-хроматография на сефадексе G-25	24.9	1600	64.1	61.1	4.1
Гель-хроматография на сефадексе G-100	0.27	400	1480	16.2	80.7

активность выражали в Е/мг белка. Белок определяли по Лоури и спектрофотометрически на СФ-56 (Россия) при 260 нм. Гомогенность выделенной фракции фермента устанавливали в 7.5%-ном ПААГ [11]. Электродным буфером служил 0.5 М Трис-глициновый буфер, рН 8.3. Напряжение электрического тока подбиралось из расчета 2 мА на 1 кармашек. Идентификацию белка проводили нитратом серебра.

Фотоокисление β -глюкозидазы осуществляли при значениях рН 3.0–8.0 и 25°C в присутствии 5×10^{-6} М раствора метиленовой сини [12]. В качестве источника света использовали лампу накаливания мощностью 200 Вт с красным светофильтром на расстоянии 10 см от поверхности освещаемого раствора.

Модификацию фермента диэтилпиноксикарбонатом (ДЭПК) проводили, рассчитывая так, чтобы в реакционной смеси концентрация спирта составляла не более 1.25% (такая концентрация этанола не изменяла активность фермента) [12]. К раствору фермента добавляли ДЭПК в концентрации 6×10^{-4} М, которая была подобрана в

предварительных опытах. Исследования осуществляли при 25°C, рН 5.6 и концентрации субстрата 10 мМ.

В работе использовали сефадексы G-25 и G-100 фирмы “Pharmacia” (Швеция), реагенты для электрофореза, диэтилпиноксикарбонат, п-НФГ фирмы “Sigma” (США), остальные реактивы марок х.ч. и ч.д.а. — отечественные.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение высокоочищенного препарата β -глюкозидазы. В результате проведенной работы по выделению и очистке цитоплазматической β -глюкозидазы растений гороха (табл. 1) был получен препарат со степенью очистки 80.7 раз и удельной активностью 1480 Е/мг белка. Электрофорез в системе Девис и Лэммли [12] показал, что полученный препарат фермента был гомогенен (рис. 1), давая четко выраженную полосу с $R_f = 0.39$. Это близко к полученным ранее величинам R_f фермента растений гороха [8].

Определение каталитически активных групп β -глюкозидазы. Одним из методов обнаружения каталитически активных групп является анализ зависимости активности фермента от величины рН среды, $v = f(\text{pH})$ (рис. 2) [13]. Данная зависимость позволяет определить значения рК ионных групп белка, участвующих в акте катализа. Как видно на рис. 2, профиль кривой зависимости $\lg v = f(\text{pH})$ имел колоколообразную форму с оптимумом при рН 5.6. Восходящие и нисходящие ветви кривой свидетельствуют об участии в элементарном акте разрыва гликозидных связей субстрата двух функциональных групп.

Логарифмическая зависимость $\lg v = f(\text{pH})$ позволяет определить величины рК функциональных групп β -глюкозидазы, они соответствуют рК 4.3 и 6.4 (рис. 2). Первое значение рК близко карбоксильной группе (рК 3.0–4.7), второе — рК имидазола гистидина (рК 5.6–7.0) [13]. Полученные результаты совпадают с данными других авторов [4], показав-

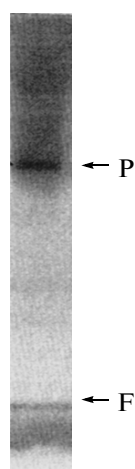


Рис. 1. Электрофореграмма цитоплазматической β -глюкозидазы растений гороха (F — фронт красителя бромфенолового синего, P — β -глюкозидаза).

ших, что в составе активного центра растительных β -глюкозидаз присутствуют карбоксильные группы.

Однако совпадение величины pK , определяемой по кривой $\lg v = f(pH)$, с pK известной химической группы, не является достаточным основанием для однозначной идентификации группы. Считается [14], что из-за свернутости молекулы фермента в глобулы на каталитически активные группы могут оказывать индуктивное воздействие соседние группы, в связи с чем величины констант диссоциации могут колебаться в широких пределах. Поэтому величина pK может служить лишь характеристикой для предварительного заключения об участии определенной группы в акте катализа исследуемого фермента.

Определение теплот ионизации каталитически активных групп β -глюкозидазы. Дополнительным подтверждением наличия в активном центре фермента каталитически активных групп является определение величин их теплот ионизации, ΔH [13]. Определение величины теплоты ионизации функциональных групп β -глюкозидазы растений гороха проводили по уравнению Вант-Гоффа:

$$\Delta H = 2.303R(pK_2 - pK_1) \frac{T_1 T_2}{T_2 - T_1}, \quad (1)$$

где ΔH – теплота ионизации каталитически активной группы, R – газовая постоянная (8.31 кДж моль⁻¹); pK_1 и pK_2 – константы ионизации функциональной группы при абсолютных температурах T_1 и T_2 .

Величины pK_1 и pK_2 определяли по сдвигу ветвей кривых $\lg v = f(pH)$, полученных при 10 и 40°C, при которых β -глюкозидаза проростков гороха достаточно стабильна. Результаты исследования представлены в табл. 2. В эксперименте при многократном повторении сдвиг pK_1 было трудно определить, так как значения ΔpK колебались в пределах ошибок опыта (≈ 0.1). Однако это обстоятельство говорило о том, что профиль восходящей ветви кривой $\lg v = f(pH)$ определяется константой диссоциации именно карбоксильной группы. По проведенным расчетам величина ΔH оказалась равной 5.6 кДж моль⁻¹, что вполне соответствовало теплоте ионизации карбоксильной группы. Сдвиг pK_2 (ΔpK 0.6) для нисходящих ветвей кривых соответствовал теплоте ионизации имидазольной группы (ΔH 33.9 кДж моль⁻¹). Следует отметить, что величина ΔH является важным критерием идентификации функциональных групп ферментов [14].

Фотоокисление β -глюкозидазы в присутствии метиленовой сини. Для доказательства участия в акте катализа β -глюкозидазы проростков гороха имидазольной группы гистидина было необходимо проведение фотоинактивации фермента в присутствии метиленового синего, которое при-

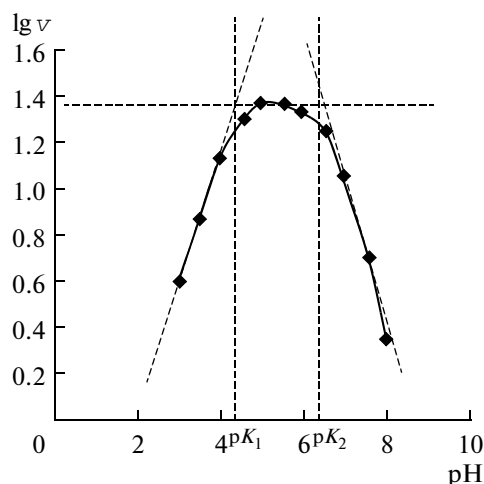


Рис. 2. Влияние pH на активность β -глюкозидазы проростков гороха при 40°C; v – скорость реакции; pK_1 и pK_2 – константы ионизации активных групп каталитического центра фермента для восходящей и нисходящей ветвей кривой соответственно.

водит к разрыву гетероцикла имидазола. Как видно на рис. 3а, β -глюкозидаза подвергалась интенсивной инактивации (кривая 1), в то время как в контрольных опытах с метиленовым синим в темноте (кривая 2) и без него на свету (кривая 3) активность фермента оставалась на постоянном уровне. Полученная зависимость $\lg(E_0/E) = f(t)$ являлась линейной (рис. 3б) и описывалась уравнением реакции первого порядка:

$$k = \frac{2.303}{t} \lg(E_0/E), \quad (2)$$

где k – константа скорости фотоинактивации (ч⁻¹), E_0 и E – активность β -глюкозидазы исходная и в момент времени t соответственно.

Как известно [15], 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 pH среды [16]. В связи с этим опыты по фотоокислению β -глюкозидазы растений гороха нами проводились в интервале pH 3.0–8.0 при 25°C в течение 4 ч. Как видно на

Таблица 2. Величины pK и ΔH каталитически активных групп β -глюкозидазы растений гороха

Ветвь кривой	pK		ΔpK	ΔH , кДж/моль
	10°C	40°C		
Восходящая	4.4	4.3	0.1	5.6
Нисходящая	6.8	6.2	0.6	33.9

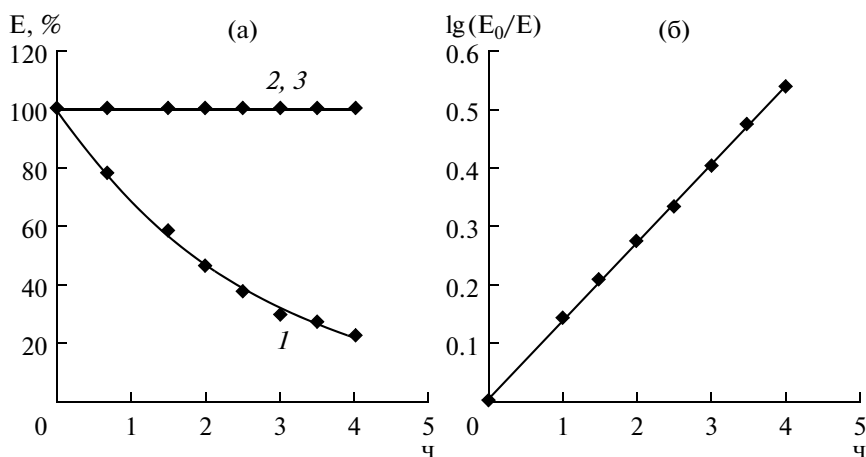


Рис. 3. Инактивация β -глюкозидазы фотоокислением метиленовым синим на свету (а) при рН 5.6 и 25°C (1), без метиленового синего на свету (2), с метиленовым синим в темноте (3); б – зависимость $\lg(E_0/E) = f(t)$. E_0 и E – активность фермента, исходная и в момент времени t соответственно (%), t – время инкубации, ч.

рис. 4, в контрольных опытах активность фермента практически не изменялась. С увеличением рН среды интенсивность фотоинактивации β -глюкозидазы возрастала. Известно [14], что при высокой концентрации H^+ -ионов имидазольная группа протонируется и становится препятствием для отдачи электронов под действием квантов света. С увеличением рН среды по мере депротонирования имидазольной группы интенсивность фотоокисления возрастала. Таким свойством не обладают ни фенольная группа тирозина, ни индольная группа триптофана. Исходя из вышеизложенного, скорость фотоинактивации β -глюкозидазы можно описать следующим уравнением:

$$k = k_0 / (1 + [H^+] / K_2), \quad (3)$$

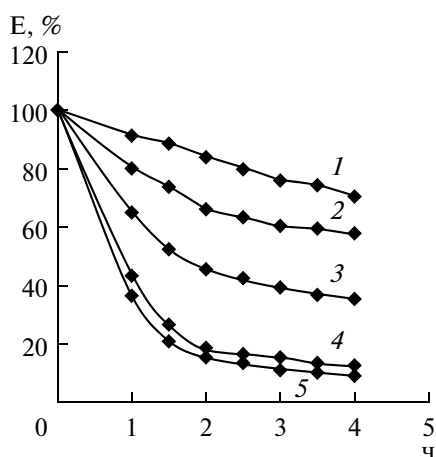


Рис. 4. Фотоинактивация β -глюкозидазы проростков гороха в присутствии метиленового синего при различных рН: 1 – 3.0; 2 – 4.0; 3 – 5.0; 4 – 6.0; 5 – 7.0.

где k – константа скорости фотоинактивации ($ч^{-1}$) при соответствующей величине рН, k_0 – максимальная константа скорости фотоокисления.

На рис. 5 представлена зависимость $k = f(pH)$. Эта кривая имеет S-образную форму, характерную для кривых титрования ионных групп. При рН 6.8 и выше кривая выходит на плато, соответствующее k_0 . Как видно на рис. 3, прямая, проведенная параллельно оси абсцисс на расстоянии от нее, равной $k_0/2$, дает точку пересечения с кривой, соответствующую величине $pK_2 = 6.25$, что характерно для имидазольной группы гистидина.

Модификация β -глюкозидазы диэтилпирикарбонатом. О важной роли имидазольной группы гистидина в действии β -глюкозидазы свидетельствуют и

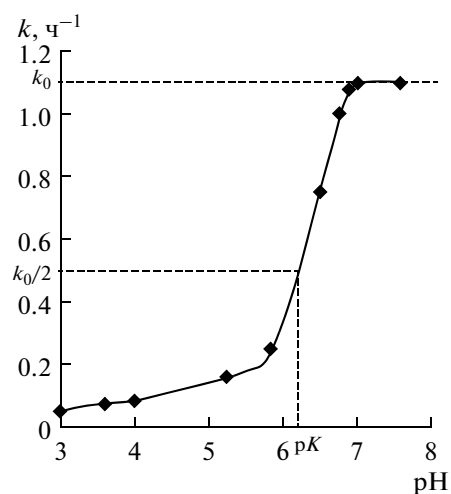


Рис. 5. Зависимость $k = f(pH)$ при фотоокислении β -глюкозидазы проростков гороха при 25°C в течение 4 ч, k – константа скорости инактивации, $ч^{-1}$.

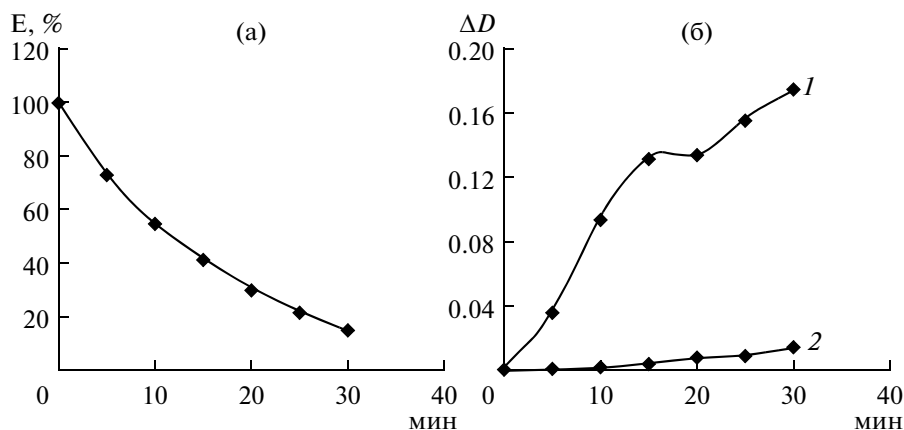


Рис. 6. Инактивации β -глюкозидазы проростков гороха ДЭПК при 25°C (а); динамика изменения оптической плотности при внесении ДЭПК в среду определения активности фермента (ΔD) при 240 (1) и 270 нм (2) (б).

исследования с ДЭПК, специфическим реагентом на эту группу [17]. При внесении в среду ДЭПК между имидазольной группой β -глюкозидазы и реагентом развивается реакция, ведущая к образованию N-этоксиформилимидазола. На рис. 6 представлены результаты проведенных нами опытов по влиянию ДЭПК на активность β -глюкозидазы гороха при 25°C. Как видно, этоксикарбонилирование имидазольной группы гистидина ДЭПК приводит к инактивации β -глюкозидазы, развивающейся по экспоненциальному закону (рис. 6а). Отмечается существенное повышение поглощения света раствором фермента с ДЭПК при 240 нм с увеличением экспозиции до 30 мин и незначительное его изменение при 270 нм (рис. 6б), что является важной особенностью для монокарбэтоксипроизводного гистидина, а не тирозина (рис. 6б). Это также подтверждают полученные нами результаты об участии в акте катализа β -глюкозидазы имидазольной группы гистидина.

Таким образом, проведенные нами исследования по выявлению каталитически активных групп в активном центре цитоплазматической β -глюкозидазы растений гороха с помощью расчетов величин pK и теплот ионизации (ΔH) ионогенных групп позволяют говорить о том, что в разрыве глюкозидной связи субстратов принимают участие карбоксильная группа глутаминовой или аспарагиновой кислот и имидазольная группа гистидина, находящиеся в активном центре данного фермента. Исследования по фотоинактивации β -глюкозидазы в присутствии фотосенсибилизатора и инактивации под действием ДЭПК подтвердили наличие имидазольной группы гистидина в активном центре β -глюкозидазы растений гороха.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seidle H.F., McKenzie K., Marten I. // Arch. Biochem. Biophys. 2005. V. 444. № 1. P. 66–75.
2. Туран Ю., Женг М. // Биохимия. 2005. Т. 70. № 12. С. 1656–1663.
3. Туран Ю. // Биохимия. 2008. Т. 73. № 8. С. 1131–1140.
4. Пасешниченко В.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 1989. Т. 25. № 4. С. 435–449.
5. Захарова Н.С., Петрова Т.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 4. С. 458–461.
6. Gerardi C., Blando F., Santino A. // Plant Science. 2001. V. 160. № 5. P. 795–805.
7. Sue M., Yamazaki K. // Plant Physiology. 2006. V. 141. № 4. P. 1237–1247.
8. Ershova A.N. // Eur. J. Biochem. 2001. V. 268. № 1. P. 250–251.
9. Takashi A., Hanae K., Naoto S. // Phytochemistry. 1998. V. 48. № 1. P. 49–54.
10. Еришова А.Н., Гущина Н.А. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2003. Т. 3. № 6. С. 758–766.
11. Davies B.J. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1964. V. 121. № 4. P. 404–427.
12. Ковалева С.В., Дорожко А.И., Каган З.С. // Биохимия. 1984. Т. 49. № 8. С. 1253–1261.
13. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. Т. 2. 234 с.
14. Жеребцов Н.А., Корнеева О.С., Тертычная Т.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 1995. Т. 35. № 2. С. 123–132.
15. Лосева Л.П., Бендианишвили М.В. // Биохимия. 1986. Т. 51. № 5. С. 840–849.
16. Кочетов Г.А. Тиминовые ферменты. М.: Наука, 1978. 74 с.
17. Буник В.И., Гомазкова В.С. // Биохимия. 1987. Т. 52. № 8. С. 1235–1247.

Identification of Catalytically Active Groups of Pea (*Pisum sativum* L.) β -Glucosidase

A. N. Ershova and O. N. Barkalova

Voronezh State Pedagogical University, Voronezh, 394043 Russia

e-mail: aershova@vspu.ac.ru

Received April 15, 2010

Abstract—Functional groups of cytoplasmic pea β -glucosidase pretreated to an electrophoretically homogeneous state were identified. Data on the pH dependence of the enzyme activity, calculated heat of ionization, photoinactivation of the enzyme in the presence of methylene blue, and inactivation of the enzyme with diethyl pyrocarbonate suggest that the catalytic site of β -glucosidase contains the carboxyl group of glutamic or aspartic acids and the imidazole group of histidine.