

УДК 577.154.2

ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В МОЛЕКУЛЕ β -ГЛЮКОЗИДАЗЫ ИЗ *Thermotoga maritime* НА ГИДРОЛИЗ ИЗОФЛАВОНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ СОИ, СТАБИЛЬНОСТЬ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

© 2013 г. Ю. Хие*, С. Сонг**, Х. Сун**, З. Цао***

*Департамент науки продовольствия и питания, колледжа Гин-Лин, Университет Нанкина, Нанкин, Китай 210097

**Колледж наук о жизни, Университет Нанкина, Нанкин, КНР 210023

***Медицинский университет Нанкина, Первая больница, Нанкин, КНР 210006

e-mail: caozhigang11@sina.com; xueyemin@njnu.edu.cn

Поступила в редакцию 15.10.2013 г.

Термостабильная β -глюкозидаза (TmBglA) из *Thermotoga maritime* — перспективный биокатализатор для получения изофлавоновых агликонов. Для эффективного гидролиза соевых изофлавоновых конъюгатов необходим поиск ферментов с высокой специфичностью к природным субстратам. Изучено влияние аминокислот, расположенных в агликонсвязывающем кармане с неконсервативными остатками специфичных групп фермента, принадлежащего семейству 1 гликозидгидролаз (GH1), с использованием TmBglA (дикого типа) из *T. maritime* и трех мутантных, в которых были произведены замены аминокислот — M1-TmBglA, M2-TmBglA и M1M2-TmBglA. Три мутантных белка были экспрессированы в *Escherichia coli*, выделены и охарактеризованы. Мутации привели к сдвигам в значениях оптимальной температуры, термостабильности, сужению кривой рН-зависимости в результате удаления ионизированной боковой цепи. Все мутации снижали эффективность катализа, по отношению к природным субстратам, таким как гликозид салицина, по сравнению с синтетическим *p*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозидом. Это свидетельствует о том, что замененные аминокислоты являются ключевыми, определяющими специфичность к агликону. Меньшая степень гидролиза генистеина и даидзеина ферментом M2-TmBglA, по сравнению с M1-TmBglA, свидетельствовала в пользу того, что остатки L400, A407 и E408 в TmBglA в большей степени необходимы для проявления каталитической активности и связывания соевого изофлавонового гликозида, чем V170, A171, V173, G174, H180.

DOI: 10.7868/S0555109913050152

Изофлавоны — структурные гомологи человеческого эстрогена, существуют в виде гликозидов и в наибольшем количестве присутствуют в сое. Широко известен тот факт, что эстрогенная активность соевых изофлавонов может использоваться в оздоровительных целях, кроме того в целях профилактики некоторых видов рака [1], снижения риска сердечно-сосудистых заболеваний и улучшения состояния костей [2, 3]. Изофлавоновые агликоны обладают более высокой фармацевтической активностью, по сравнению с изофлавоновыми гликозидами [4, 5]. Способность многих бактериальных и грибных β -глюкозидаз к гидролизу последних с образованием агликонов — предмет многочисленных исследований в последние годы. Наиболее перспективны для применения термостабильные β -глюкозидазы из *Dictyoglomus turgidum*, *Sulfolobus solfataricus*, *Pyrococcus furiosus*, *Thermoanaerobacter ethanolicus* и *Thermotoga maritime*, обладающие высокой гидролитической активностью в отношении изофлавоновых

конъюгатов [6–10]. Растительные β -глюкозидазы из *Glycine max* (soybean), *Dalbergia nigrescens* и *Zea mays* (кукуруза) более активны с изофлавоновыми гликозидами, чем с *p*-нитрофенил-гликозидом (рНФГ), и гидролизуют изофлавоновые гликозиды с высокой степенью эффективности [11–13].

Недавно были проведены исследования некоторых растительных β -глюкозидаз из бобовых, миндаля, а также из термофильных грибов и бактерий с целью сравнения их способности к гидролизу конъюгатов изофлавонов сои из соевых бобов [9, 12, 14]. Были обнаружены различия в гидролизе соевых изофлавонов этими ферментами, что свидетельствует об их различной специфичности к этим субстратам. Однако наши знания о том, что определяет специфичность β -глюкозидазы к агликонам на молекулярном уровне весьма ограничены, хотя возможность изменить специфичность фермента важна для выяснения механизма гидролиза и биотехнологического применения фермента.

В предыдущей работе было показано, что применение термостабильной β -глюкозидазы (TmBglA) из *T. maritima*, эффективно гидролизующей изофлавоновые гликозиды, увеличивает содержание изофлавоновых агликонов в соевой муке, что позволяет получать агликоны в одну стадию [10]. Такой подход предполагает использование ферментов с высокой термостабильностью. TmBglA может быть перспективным биокатализатором при использовании ее для реализации способа очистки с термической обработкой. Однако фермент гидролизует изофлавоновые конъюгаты менее эффективно чем *p*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид (пНФГ). β -глюкозидаза другого типа из *Glycine max* (GmGH1) обладает высокой специфичностью к соевым изофлавоновым конъюгатам, эффективно их гидролизует, по сравнению с пНФГ, при разных условиях связывания [11]. Выявление факторов, определяющих различия в специфичности β -глюкозидаз различного происхождения к агликонам поможет раскрыть детали механизма катализа, что, в свою очередь, позволит рационально оптимизировать их субстратную специфичность к изофлавоновым гликозидам.

β -глюкозидаза (КФ 3.2.1.21, TmBglA) принадлежит к семейству 1 гликозид-гидролаз (GH1) и катализирует гидролиз β -глюкозидных связей с сохранением аномерной конфигурации. Методом рентгеноструктурного анализа была определена трехмерная структура этого фермента. Показано, что фермент имеет конфигурацию бочки, состоящей из 8 повторов α/β -структур [15]. В семействе TLNER и ITENG являются высоко консервативными пептидными фрагментами, которые содержат, в том числе и два аминокислотных остатка Глу, участвующих в катализе — E166 и E351 (нумерация по TmBglA, рис. 1). Эти аминокислоты расположена в β -листах 4 и 7, и составляют часть активного центра, имеющего форму кратера. Роль этих остатков в катализе была установлена с помощью мутагенеза, а также с помощью ингибиторных исследований с ферментами семейства 1 β -глюкозидаз [16–18]. Однако, мало известно о том, как именно β -глюкозидазы связывают агликон. Если связывающие сахар аминокислотные остатки высоко консервативны для всех ферментов семейства 1, аминокислоты, расположенные в связывающемся с агликоном кармане различаются у разных ферментов (рис. 1).

На основании сравнения аминокислотной последовательности ферментов семейства 1 и анализа структурной модели TmBglA было высказано предположение, что следующие аминокислотные остатки участвуют в связывании агликона V170, V173, H180, A407 и E408. Рассмотрены 3 дополнительных аминокислотных остатка A171, G174 и L400, которые также могут влиять на связывание агликона, и которые расположены в непосредственной близости от TLNER и ITENG моти-

вов в TmBglA. Для того, чтобы выявить их влияние на гидролиз соевых изофлавоновых гликозидов, стабильность и каталитические свойства фермента были осуществлены мутации по этим аминокислотным остаткам и исследован гидролиз искусственного субстрата пНФГ и природного гликозида салицина. Эти субстраты имеют общую β -гликозидную группу и различные агликоновые фрагменты. Проведено исследование pH-зависимости и термической стабильности при гидролизе соевых изофлавоновых гликозидов для TmBglA дикого типа и мутантов.

Цель работы — исследовать, каким образом аминокислотные остатки, связывающие агликон и участвующие в катализе, определяют специфичность нативного фермента.

МЕТОДИКА

Материалы. Для экспрессии гена β -глюкозидазы A использовали штамм *Escherichia coli* JM109 (DE3) (“Promega”, США). Ген из *T. maritima* экспрессировали с помощью T₇ РНК-полимеразной системы экспрессии с плазмидой pET-20b (“Novagen”, США)

Клетки культивировали при 37°C в среде Луриа-Бертани (LB), в присутствии ампициллина (100 мкг/мл). ДНК-модифицирующие ферменты и полимеразы были получены из “Takara” (Китай), *p*-нитрофенол, рНФГ, салицин, стандарты изофлавонов, даидзеин и генистеин — “Sigma” (США).

ДНК-манипуляции. Манипуляции с ДНК проводили в соответствии с ранее описанными протоколами [19]. ДНК трансформацию проводили с использованием набора GenePulser (“Bio-Rad”, США). Плазмидная ДНК и продукты ПЦР были выделены и очищены с использованием Qiagen plasmid kit и PCR purification kit (“Qiagen”, USA). ПЦР проводили в приборе PE Applied Biosystems 9700 thermal cycler (“Foster City”, USA) с использованием стандартных условий для проведения реакции.

Получение плазмид, содержащих мутантный ген. Дизайн плазмиды осуществляли согласно стандартным протоколам [19]. Ген β -глюкозидазы A из *T. maritima*, *bglA*, основываясь на заявленном в генбанке (Genbank, X74163), был амплифицирован и лигирован в сайты рестрикции *Eco* RV и *Pst*I плазмиды pET-20b, которая названа pET-20b-*TmBglA*. В качестве праймеров были использованы четыре синтетических олигонуклеотида P1, P2, P3 и P4 для замены кодонов аминокислотных остатков V170, A171, V173, G174, H180, L400, A407 и E408 в TmBglA на кодоны AAA, CCA, AAA, AGC, AAA, AAA и CGC (табл. 1). Все олигонуклеотиды были синтезированы в “Sangon” (Shanghai, Китай). ПЦР-амплификация проводилась

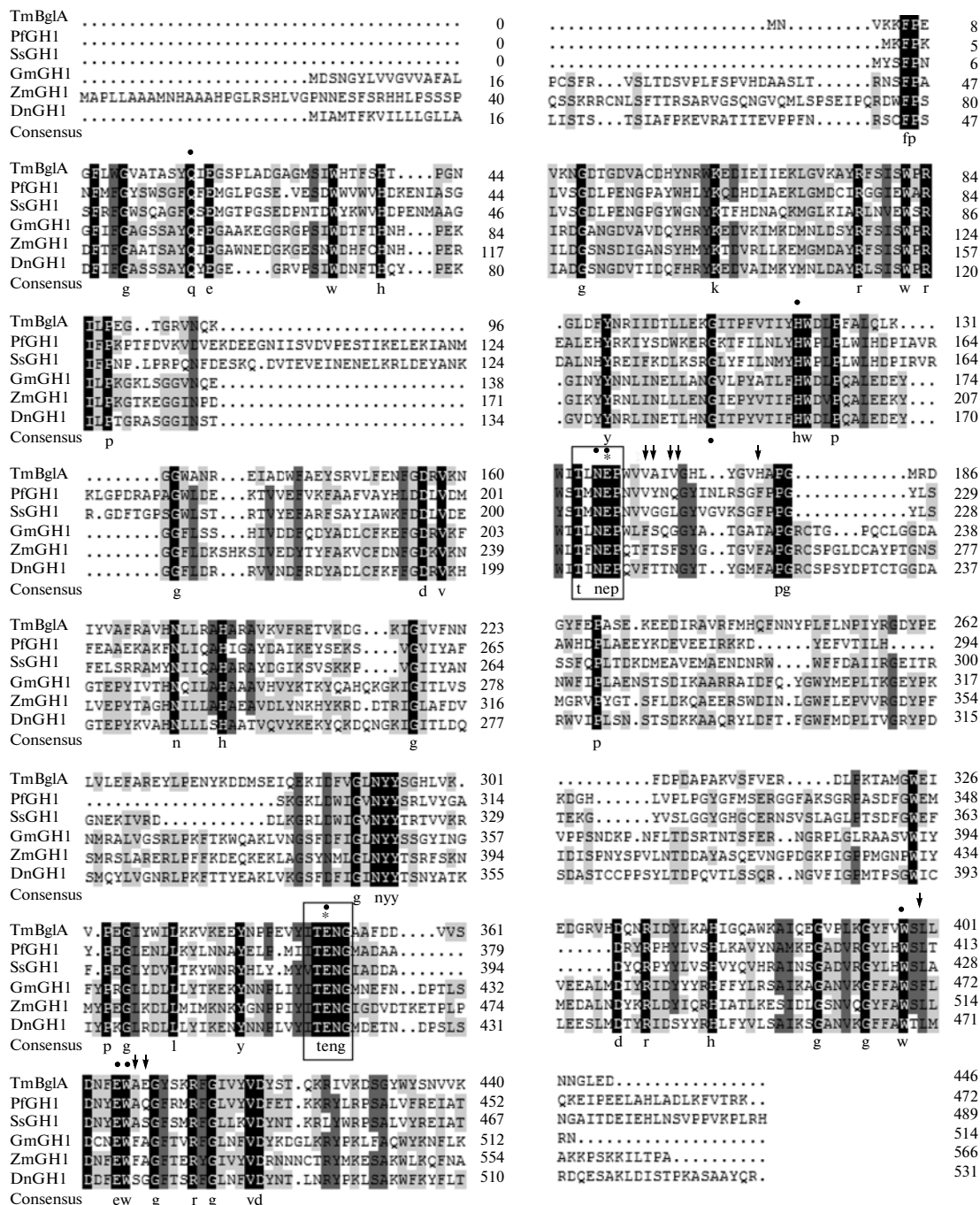


Рис. 1. Сопоставление аминокислотной последовательности TmBglA *T. maritima* (X74163) с другими последовательностями семейства 1 β-глюкозидазы. Сопоставлены следующие ферменты (регистрационный номер): ZmGH1 – β-глюкозидаза из *Zea mays* (AAA65946); DnGH1 – β-глюкозидаза из *Dalbergia nigrescens* (AY766303); GmGH1 – β-глюкозидаза из *Glycine max* (AB259819); SsGH1: – β-глюкозидаза из *Sulfolobus solfataricus* (P22498) и PfGH1 – β-глюкозидазы из *Pyrococcus furiosus* (AAC25555). Аминокислоты, обозначенные стрелками, были выбраны для направленного мутагенеза. Высококонсервативные или подобные аминокислоты β-глюкозидазы выделенные сплошным или серым соответственно. Высококонсервативные мотивы TFNER и ITENG даны в прямоугольниках, соответствующие каталитические аминокислотные остатки отмечены звездочкой. Сахарсвязывающие аминокислотные остатки направлены кружочками.

программой из 35 циклов с использованием Ru-robest ДНК полимеразы (“ТаКаРа”, Китай) в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 0.2 мМ

каждого дНТФ, 20–35 пмоль каждого праймера и 0.05 мкг плазмиды pET-20b-*TmBglA*. Каждый цикл состоял: нагревание при 95°C 5 мин, 94°C в течение

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности использованных праймеров

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'-3')*	Заменяемая аминокислота
P1	<i>TTT AGC</i> (GTGGGG) KAT CTG TAC GGA GTC <i>TTT</i> (CAC) GCT CCT GGA ATG AGA GAT	V173F, G174S, H180F
P2	TAT <i>GGT AAA</i> (GGCAAC) AAC CCA CGG TTC GTT CAAGGT GAT CCA GTT CTT CAC	V170F, A171T
P3	GAA TGG <i>TTT GCG</i> (GCAGAG) GGA TAT TCC AAG AGA TTT GG	A407F, E408A
P4	GAA ATT GTC <i>AAA</i> (GAG) GAG CGA CCA GAC GAA GTA	L400F

* Нуклеотиды в скобках – нативные нуклеотиды сайтов мутации. Курсивом показаны нуклеотиды после мутации. Нуклеотиды в скобках были заменены на нуклеотиды, показанные курсивом.

50 с, 50°C 40 с и 72°C 2 мин 30 с. ПЦР-продукты очищали с использованием набора для очистки продуктов ПЦР “QIAquick PCR” и проводили фосфатирование с T4 полинуклеотидкиназой, лигировали в T₇ экспрессионный вектор pET-20b, с получением pET-20b-m1-TmBglA, pET-20b-m2-TmBglA, pET-20b-m1m2-TmBglA. Очистку рекомбинантных плазмид проводили с помощью набора QIAmini-prep kit (“Qiagen”, США). Вставки затем секвенировали в Biological Services Unit of Shang Hai (Китай). Нуклеотидная и аминокислотная последовательности были проанализированы с использованием программного обеспечения Dna-man версии 6.0 (“Lynnon Biosoft”, США).

Экспрессия и очистка. Клетки *E. coli* JM109 (DE3) были трансформированы соответствующими векторами экспрессии pET-20b-TmBglA, pET-20b-m1-TmBglA, pET-20b-m2-TmBglA and pET-20b-m1m2-TmBglA и выращены при 37°C в 100 мл в среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампицилина. Клетки индуцировали при достижении значения OD₆₀₀ 0.6–0.8 добавлением 0.25 мМ изо-пропилтио-β-галактопиранозида (ИПТГ), после чего выращивание продолжали в течение 10 ч. Клетки собирали центрифугированием при 9600 × g при 4°C в течение 20 мин. Осадок суспензировали в буфере для связывания (5 мМ имидазола и 0.5 М NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH 7.9), проводили лизис 3 циклами на френч-прессе (“Thermo Electron”, США), полученный гомогенат затем центрифугировали при 9600 × g, при 4°C 30 мин. После термической обработки в течение 20 мин при 70°C белковые фракции собирали центрифугированием и наносили на колонку для металл-аффинной хроматографии, заполненную с Ni-хелатной смолой (“Novagen”, США). Несвязавшиеся белки элюировали связывающим буфером, после чего через колонку пропускали буфер для промывания (60 мМ имидазол, 0.5 М NaCl в

20 мМ трис-HCl, pH 7.9). Ферменты дикого типа и мутантные с гистидиновой меткой смывали буфером для элюирования (1.0 М имидазол, 0.5 М NaCl в 20 мМ трис-HCl, pH 7.9), собирали и использовали для последующего анализа в ПААГ с Na-ДДС в 10%-ном полиакриламидном разделяющем геле и 4%-ном концентрирующем.

Определение ферментативной активности. Активность β-глюкозидазы оценивали по образованию п-нитрофенола из пНФГ. Реакционная смесь содержала 10 мкл фермента соответствующего разведения, 170 мкл 0.1 М калий-фталатного буфера (КФБ, pH 6.2) и 20 мкл раствора субстрата (20 мМ пНФГ). После инкубации при 65°C в течение 5 мин реакцию останавливали добавлением 0.6 мл 1.0 М Na₂CO₃, и регистрировали D₄₀₅. Стандартная кривая была получена с использованием п-нитрофенола. Единицу активности TmBglA и мутантных белков определяли как количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль п-нитрофенола за 1 мин.

Активность β-глюкозидазы в реакции гидролиза с салицином в качестве субстрата определяли, анализируя количество освободившейся глюкозы (“Sigma”, США) в соответствии с модифицированным методом [9]. Реакционную смесь (0.1 мл), содержащую 1.0 мМ салицин, 50 мМ КФБ (pH 6.2) и фермент, разведенный в том же буфере, инкубировали при необходимой для протекания реакции температуре в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 0.75 мл 3,5-динитросалициловой кислоты, реакционную смесь кипятили 5 мин, охлаждали на ледяной бане и измеряли D₅₂₀ [20]. Ферментативную активность выражали в международных единицах (Ед.), как количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль глюкозы за 1 мин.

Определение концентрации белка. Общую концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд с использованием БСА (“Sigma”, США) в качестве стандарта [21].

Кинетические параметры. Для определения кинетических параметров (K_M , V_{\max} , $k_{\text{кат}}/K_M$), скорость ферментативной реакции измеряли при оптимальных концентрациях субстратов. Для салицина использовали интервал концентраций 2.0–20 мМ, и для пНФГ интервал от 0.2 до 2.0 мМ. Кинетические параметры (K_M и V_{\max}), определяли по уравнению Михаэлиса-Ментен в координатах Лайнувера-Берка. Параметры, определяющие эффективность процесса $k_{\text{кат}}/K_M$, были рассчитаны при определении субстратной специфичности для каждого фермента. Для расчета $k_{\text{кат}}$, использовали значение молекулярной массы 52338 Да для TmBglA. Каждый эксперимент был проведен дважды, и каждое измерение проводили в 3 повторностях. Относительное стандартное отклонение не превышало 2%.

Зависимость от pH и температуры, термостабильность β -глюкозидазы. Оптимальное значение pH для действия фермента определяли, используя 0.1 М фталат-имидазольный буфер (ФИБ), в интервале от 3.4 до 8.2 при 80°C. Значение оптимальной температуры определяли при оптимальном pH. Аликвоты очищенного белка инкубировали при различных температурах (от 50 до 95°C), после чего активность β -глюкозидазы определяли, как это описано ниже. Самую высокую остаточную активность принимали за 100%. Для определения термостабильности очищенные ферменты предварительно инкубировали при оптимальном pH и различной температуре от 45 до 95°C в течение 1 ч без субстрата, после чего охлаждали на ледяной бане и проводили измерение активности ферментов в оптимальных условиях, как это описано выше. Активность фермента без предварительной инкубации принимали за 100%. Для исследования pH-стабильности очищенные ферменты инкубировали в 0.1 М ФИБ при различных значениях pH от 3.8 до 8.2 в течение 1 ч при 37°C, затем отобранные аликвоты вносили в стандартную реакционную смесь для определения остаточной активности фермента. Активность фермента без предварительной инкубации принимали за 100%.

Гидролиз изофлавоновых гликозидов. Для сравнения гидролитической активности 3 мутантных ферментов в реакции с изофлавоновыми гликозидами 0.1 мкМ даидзеина или генистеина инкубировали с одним из выделенных мутантных ферментов (TmBglA, M1-TmBglA, M2-TmBglA и M1M2-TmBglA) в 50 мМ ФКБ буфере (pH 6.2). Реакционную смесь выдерживали в термостате при температуре 70°C в течение 40 мин и 1 ч. Использовали равные молярные концентрации

4 ферментов с тем, чтобы исследовать их эффективность в реакции гидролиза с изофлавоновыми гликозидами. Реакции были остановлены охлаждением во льду перед измерением. Гидролизованные растворы экстрагировали 80%-ным метанолом при комнатной температуре в течение 1 ч. Метанольный экстракт центрифугировали при 13000 g в течение 20 мин. Степень гидролиза даидзеина и генистеина определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием силикагеля 60 F254 (“Yantai Jianguyou Silica Gel Development Co.”, Китай) [12]. Аликвоты метанольного экстракта наносили на пластины. Для разделения использовали смесь этилацетат–бутанол–метанол–вода (10 : 7 : 1 : 1, об./об.). Результат разделения веществ на пластинах наблюдали при OD_{254} .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование, экспрессия и выделение мутантных ферментов. Были созданы три вектора экспрессии, кодирующие измененную β -глюкозидазу. Нуклеотидная последовательность каждой мутантной β -глюкозидазы А была подтверждена методом секвенирования ДНК. Ферменты TmBglA, ZmGH1 и GmGH1 обладали различным сродством как к природным флавоноидным гликозидам, так и пНФГ, поэтому аминокислотные остатки V170, A171, V173, G174 и H180 были изменены на соответствующие аминокислотные остатки из ZmGH1 фермента, т.е. были произведены следующие замены V170F /A171T /V173F /G174S /H180F. Полученный белок был обозначен M1-TmBglA. Аминокислотные остатки L400, A407 и E408 были заменены на соответствующие остатки в GmGH1, путем произведения следующих замен: L400F /A407F /E408A. Полученный белок обозначили M2-TmBglA. Двойной мутант (V170F /A171T /V173F /G174S /H180F /L400F /A407F /E408A) был назван M1M2-TmBglA. Аминокислотные последовательности измененных участков показаны на рис. 1. Мутантные ферменты и дикого типа экспрессировали в *E. coli*, выделяли с помощью Ni-аффинной хроматографии. Полученные белки проявлялись на электрофорезе в ПААГ с Na-ДДС в виде одной полосы, соответствующей белку с молекулярной массой 52 кДа (рис. 2).

Кинетические параметры β -глюкозидаз мутантных и дикого типа. Исследованы кинетические параметры мутантов и фермента дикого типа в реакции с искусственным субстратом пНФГ и природным субстратом салицином. Оба субстрата принадлежат к одной и той же группе β -гликозидов, но обладают разными агликонами. Полученные результаты приведены в табл. 2. Значения K_M (мМ) для M1-TmBglA и M1M2-TmBglA, полученные с субстратом пНФГ, – 1.14 и 1.06 соответ-

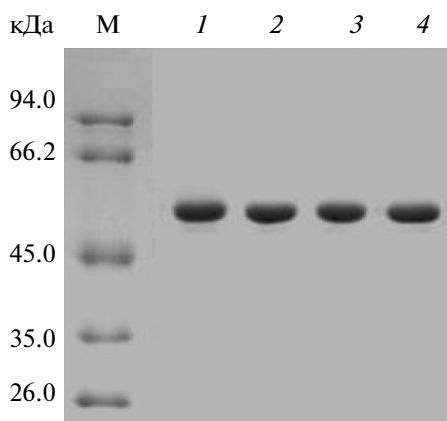


Рис. 2. Электрофорез очищенных β -глюкозидаз дикого типа и мутантов в ПААГ с Na-ДДС. М – стандарты молекулярной массы; 1 – TmBglA-WT; 2 – M1-TmBglA; 3 – M2-TmBglA; 4 – M1M2-TmBglA. (За исключением стандартов, наносили по 2 мкг белка).

ственно, выше, чем для фермента дикого типа 0.44. Значения K_M (мМ) для M2-TmBglA – 0.54 незначительно выше. Значения $k_{кат}$ (c^{-1}) для M2-TmBglA и M1M2-TmBglA – 94.3 и 18.7 соответственно, что ниже, чем для фермента дикого типа (164.6), в то же время значение $k_{кат}$ для M1-TmBglA осталось без изменений. Аналогично, значения K_M (мМ) для M1-TmBglA, M2-TmBglA, M1M2-TmBglA в реакции с салицином составили 18.0, 18.3 и 18.2 соответственно, что было выше, чем для фермента дикого типа (12.4), при этом значения $k_{кат}$, полученные для M1-TmBglA, M2-TmBglA, M1M2-TmBglA в реакции с салицином, составили 24.6, 34.4 и 2.33 c^{-1} соответственно, что значительно ниже по сравнению со значением для фермента дикого типа (167.7). Значения $k_{кат}/K_M$ ($c^{-1} мМ^{-1}$), полученные для M1-TmBglA, M2-TmBglA, M1M2-TmBglA в реакции с пНФГ и салицином, были 141.5

и 1.35; 1.83 и 173.1; 17.4 и 0.12 соответственно, для фермента штамма дикого типа 366.3 и 13.2. Таким образом, у белков мутантов было обнаружено снижение эффективности катализа, что проявлялось в большей степени при использовании в качестве субстрата салицина, по сравнению с искусственным субстратом.

Зависимость активности мутантной β -глюкозидазы и дикого типа от температуры и pH. Зависимость активности мутантных ферментов и дикого типа от pH показаны на рис. 3 (а, в). Для фермента дикого типа и для мутанта M1-TmBglA pH-оптимум наблюдали в интервале pH 5.0–6.5 и 5.5–6.5 соответственно. Оптимальное значением pH для M2-TmBglA и M1M2-TmBglA – 6.2. Обнаружено сужение интервала pH, при котором фермент проявлял наибольшую активность, при кислых pH для мутантов M1-TmBglA и M2-TmBglA. Для мутанта M1M2-TmBglA был характерно сужение оптимального значения pH в области значений как низких, так и более высоких pH. Аналогично, было обнаружено, что M1-TmBglA обладал наибольшей стабильностью в диапазоне pH 4.2–8.3. Стабильность M1-TmBglA была выше, чем у фермента дикого типа и M2-TmBglA. В диапазоне pH 5.0–8.3 M1M2-TmBglA обладал более высокой стабильностью, чем ферменты дикого типа и M2-TmBglA. Однако уменьшение значения pH ниже 5.0 приводило к резкому снижению стабильности.

Значение оптимальной температуры и термостабильность мутантов по сравнению с этими же характеристиками фермента дикого типа показана на рис. 3 (б и г). Фермент дикого типа, M1-TmBglA и M2-TmBglA обладали максимальной активностью при 90, 85 и 80°C соответственно. Эти ферменты также были стабильны до 85°C, за исключением фермента M2-TmBglA, который полностью инактивировался при 85°C. Температурной оптимум M1M2-TmBglA – 60°C, мутантный фермент был стабилен при температурах ниже 60°C и даже при

Таблица 2. Кинетические параметры β -глюкозидаз дикого типа и мутантов*

Субстрат	Фермент	K_M , мМ	$V_{макс}$, Ед мг ⁻¹	$k_{кат}$, c^{-1}	$k_{кат}/K_M$, $c^{-1} мМ^{-1}$
пНФГ	TmBglA	0.44 ± 0.01	205.8 ± 1.0	164.6 ± 2.5	366.3 ± 0.6
	M1-TmBglA	1.14 ± 0.04	205.8 ± 2.5	164.6 ± 2.5	141.5 ± 2.9
	M2-TmBglA	0.54 ± 0.01	117.8 ± 3.1	94.3 ± 0.8	173.1 ± 1.7
	M1M2-TmBglA	1.06 ± 0.04	23.3 ± 0.4	18.7 ± 0.3	17.4 ± 0.3
Салицин	TmBglA	12.4 ± 0.3	209.6 ± 0.8	167.7 ± 0.6	13.2 ± 0.4
	M1-TmBglA	18.0 ± 0.3	30.7 ± 0.4	24.6 ± 0.3	1.34 ± 0.02
	M2-TmBglA	18.3 ± 0.3	42.9 ± 0.1	34.4 ± 0.1	1.83 ± 0.02
	M1M2-TmBglA	18.2 ± 0.4	2.97 ± 0.1	2.33 ± 0.04	0.12 ± 0.00

* Кинетические параметры определяли в пределах концентраций 2.0–20 мМ для салицина и 0.2–2.0 мМ для пНФГ. Представлены средние значения 3 экспериментов ± стандартное отклонение.

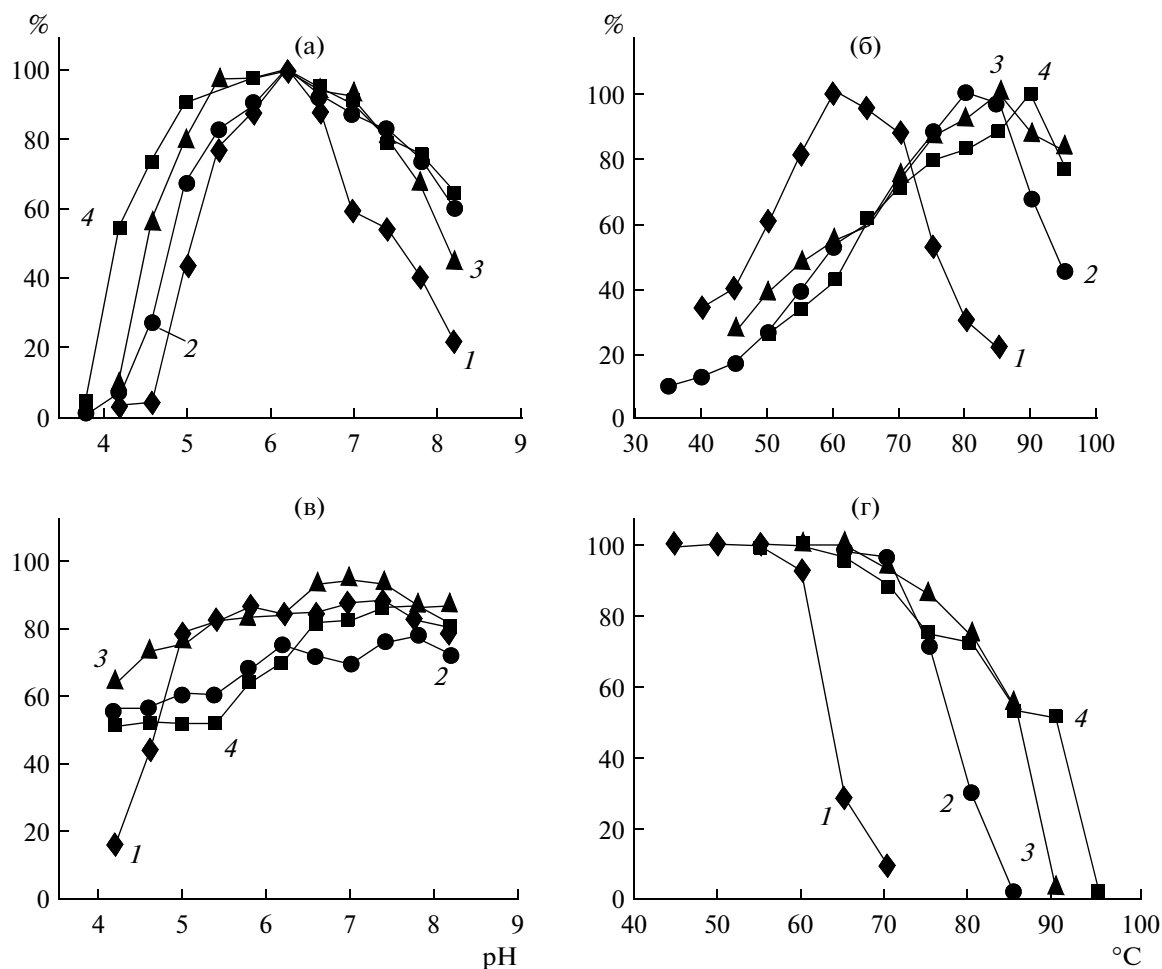


Рис. 3. Зависимость активности мутантной β -глюкозидазы M1-TmBglA (1), M2-TmBglA (2), M1M2-TmBglA (3) и дикого типа (4) от pH (а), температуры (б), pH-стабильность (в) и термостабильность (г). Представлено среднее значение 3 экспериментов, стандартное отклонение <2%.

65°C его активность снижалась на 20% от максимальной.

Гидролиз изофлавоновых гликозидов. Результаты исследования гидролиза изофлавоноидных гликозидов ферментами дикого типа и мутантно-го представлены на рис. 4. Полученные гидролизаты анализировали методом ТСХ. Два наиболее интенсивных пятна, соответствующие даидзеину и генистеину, через 40 мин реакции с TmBglA были практически полностью расщеплены. При проведении реакции с M1-TmBglA и M2-TmBglA на ТСХ обнаружено присутствие остатков этих веществ. Количество даидзеина и генистеина, оставшихся после проведения реакции гидролиза в присутствии M1M2-TmBglA, показано в рис. 4 (а, б). После 60 мин инкубации гидролиз даидзеина в присутствии M1-TmBglA и M2-TmBglA и генистеина в присутствии M1-TmBglA был завершен. Однако в реакционной смеси с генистеином и M2-TmBglA некоторое количество субстрата оставалось непрогидролизированным. При проведении реакций

гидролиза с даидзеином и генистеином в присутствии M1M2-TmBglA количество субстрата не изменялось (рис. 4 в, г). Результаты показали, что эффективность гидролиза изофлавоновых гликозидов под действием M1-TmBglA и M2-TmBglA снижена, в большей степени в реакции с генистеином в качестве субстрата в присутствии M2-TmBglA.

Аминокислотные остатки, расположенные в связывающем агликон сайте, были заменены на неконсервативные остатки, встречающиеся в семействе 1 гликозид-гидролаз (GH1) других организмов. Как показано на рис. 1, в молекуле белка TmBglA были осуществлены замены аминокислотных остатков V170, A171, V173, G174, H180 на соответствующие остатки из фермента ZmGH1 кукурузы: F, T, F, S и F соответственно. Аминокислотные остатки L400, A407 и E408 F461 были заменены на соответствующие аминокислотные остатки GmGH1 фермента сои, а именно F, F и A. Влияние этих остатков на специфичность связы-

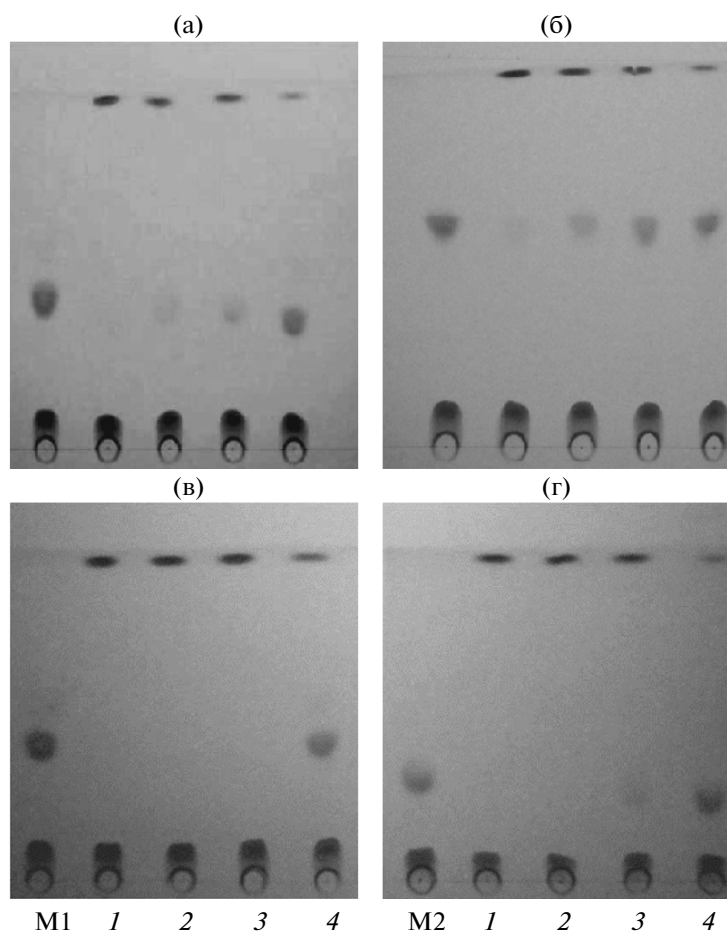


Рис. 4. ТСХ-анализ продуктов гидролиза изофлавоновых гликозидов даидзеина (а, в) и генистеина (б, г) в присутствии β -глюкозидаз мутантного и дикого типа в течение 40 мин (а, б) и 1 ч (в, г) при 65°C.
M1 – даидзеин (стандарт), M2 – генистеин (стандарт), 1 – TmBglA, 2 – M1-TmBglA, 3 – M2-TmBglA; 4 – M1M2-TmBglA.

вания агликона в настоящее время не известно. Чтобы выявить роль аминокислотных остатков, расположенных в агликонсвязывающем кармане TmBglA, были созданы 3 мутанта (M1-TmBglA, M2-TmBglA, M1M2-TmBglA). Все мутантные ферменты обладали каталитической активностью, что свидетельствует о том, что оригинальные остатки, расположенные в непосредственной близости от мотивов TLNER и ITENG (V170, A171, V173, G174, H180, L400, A407 и E408) не были необходимы для экспрессии β -глюкозидазы. Показано, что введенные мутации привели к сдвигам в температурном оптимуме ферментных белков, а также к уменьшению термостабильности и гидролитической активности по отношению к пНФГ и салицину.

Три измененных β -глюкозидазы обладали более низкой оптимальной температурой и термической стабильностью, чем фермент дикого типа, за исключением M1-TmBglA, стабильность которого практически не отличалась от стабильности нативного фермента. Особенно резкое снижение

оптимальной температуры и термической стабильностью было обнаружено у M1M2-TmBglA, что выявляет комбинированное воздействие M1-TmBglA и M2-TmBglA. На основании полученных результатов можно предположить, что мутации аминокислотных остатков, расположенных в областях, прилежащих мотивам TLNER и ITENG (V170, A171, V173, G174, H180, L400, A407 и E408), вызывают изменение структурной организации белка и, соответственно, оказывают влияние на зависимость активности ферментов от температуры. Можно предположить, что аминокислотные остатки, ответственные за термостабильность β -глюкозидазы A из *T. maritima*, распределены по всей аминокислотной последовательности, а не локализованы в определенных точках, что подтверждается также ранее опубликованными данными [22, 23].

Полученные результаты дают основание также предположить, что значения пределов pH проявления активности определяются значениями pK_a двух каталитических остатков. В нашем исследо-

вании сравнение рН-оптимумов фермента дикого типа TmBglA и M1-TmBglA и M2-TmBglA показали, что кривая рН-оптимума сузилась в кислой области, в то время как кривая зависимости от рН двойного мутанта имела узкий оптимум при 6.2 (рис. 3). Возможно, что замена H180F в M1-TmBglA и E408A в M2-TmBglA оказывали влияние на значение pK_a нуклеофильного глутамата (каталитические остатки в TmBglA: E166 и E351), его заряд или изменение в микроокружении фермента. Для β -глюкозидазы из *Agrobacterium tumefaciens* также был обнаружен сдвиг оптимального значения рН с уменьшением pK_a доноров протонов [24].

Более подробно изучена ферментативная кинетика (K_m , V_{max} , $k_{кат}/K_m$) β -глюкозидазы А дикого типа и мутантов в реакции гидролиза природного субстрата гликозида салицина и искусственного субстрата пНФГ (табл. 2). Показано, что для M1-TmBglA и M2-TmBglA эффективность катализа снизилась, причем уменьшение активности было значительнее при использовании в качестве субстрата салицина, чем для пНФГ. Значение $k_{кат}$ для M1-TmBglA в реакции с салицином было снижено на 85%, в то время как в реакции гидролиза пНФГ незначительно, что свидетельствует о важной роли V170, A171, V173, G174 и H180 в связывании агликона. Обнаружено, что для мутанта M2-TmBglA K_m при использовании в качестве субстрата салицина увеличивалась в 1.5 раза, в то время как значение K_m для пНФГ не изменялось, что предполагает важность остатков L400, A407 и E408 для узнавания агликона. Эти результаты согласуются с полученными ранее, в которых исследовалась специфичность цитозольной β -глюкозидазы человека к агликонам [25].

Исследование гидролиза изофлавоновых гликозидов дало интересные результаты. M1-TmBglA и M2-TmBglA снижали степень преобразования изофлавоновых гликозидов в агликоны, о чем свидетельствует снижение значения $k_{кат}/K_m$ для пНФГ и салицина, снижение каталитической эффективности в реакции с генистеином было значительнее в присутствии M2-TmBglA, по сравнению с M1-TmBglA. Эти результаты показывают, что аминокислотные остатки L400, A407 и E408 в сайте связывания агликона в TmBglA предпочтительнее, чем V170, A171, V173, G174, H180 и предпочтительнее чем аминокислотные остатки, расположенные в непосредственной близости от мотива TLNER. Вероятно, что эти аминокислотные остатки могут быть необходимы для катализа и связывания изофлавоновых гликозидов сои.

Таким образом, для того чтобы исследовать механизм связывания агликона в TmBglA с помощью мутаций были произведены замены аминокислотных остатков. Все мутантные ферменты продемонстрировали снижение каталитической

активности (рассчитанное значение селективности связывания $k_{кат}/K_m$) как в реакции с салицином так и в реакции с искусственным субстратом пНФГ. Это позволяет предположить, что определяющим для связывания субстрата и гидролиза TmBglA является конфигурация сайта связывания агликона. Более слабый гидролиз генистеина и даидзеина в присутствии M2-TmBglA, по сравнению с M1-TmBglA, указывает на то, что в TmBglA остатки L400, A407 и E408 являются более важными, чем V170, A171, V173, G174 и H180, и могут быть необходимыми для связывания соевого изофлавонового гликозида и катализа.

В дальнейшем предполагается использовать мутагенез по трем позициям L400, A407 и E408 в TmBglA для получения более эффективного гидролиза изофлавоновых гликозидов из сои.

Работа выполнена при поддержке проекта BK2010545 Национального научного фонда провинции Цзянсу Китая.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adlcreutz H. // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 2002. V. 83. № 1–5. P. 113–118.
2. Omoni A.O., Aluko R.E. // Nutr. Rev. 2005. V. 63. P. 272–283.
3. Ishimi Y., Miyaura C., Ohmura M., Onoe Y., Sato T., Uchiyama Y., Ito M., Wang X., Suda T., Ikegami S. // Endocrinology. 1999. V. 140. № 4. P. 1893–1900.
4. Izumi T., Piskula M.K., Osawa S., Obata A., Tobe K., Saito M., Kataoka S., Kubota Y., Kikuchi M. // J. Nutr. 2000. V. 130. № 7. P. 1695–1699.
5. Kawakami Y., Tsurugasaki W., Nakamura S., Osada K. // J. Nutr. Biochem. 2005. V. 16. № 4. P. 205–212.
6. Kim Y.S., Yeom S.J., Oh D.K. // J. Agric. Food Chem. 2011. V. 59. № 21 P. 11812–11818.
7. Kim B.N., Yeom S.J., Kim Y.S., Oh D.K. // Biotechnol. Lett. 2012. V. 34. № 1. P. 125–129.
8. Yeom S.J., Kim B.N., Kim Y.S., Oh D.K. // J. Agric. Food Chem. 2012. V. 60. № 6. P. 1535–1541.
9. Song X.F., Xue Y.M., Wang Q.L., Wu X.X. // J. Agric. Food Chem. 2011. V. 9. № 5. P. 1954–1961.
10. Xue Y.M., Yu J.J., Song X.F. // J. Ind. Microbiol. Biot. 2009. V. 36. № 11. P. 1401–1408.
11. Suzuk H., Takahashi S., Watanabe R., Fukushima Y., Fujita N., Noguchi A., Yokoyama R., Nishitani K., Nishino T., Nakayama T. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 40. P. 30251–30259.
12. Chuankhayan P., Rimlumduan T., Svasti J., Cairns J. // J. Agric. Food Chem. 2007. V. 55. P. 2407–2412.
13. Oh J.H., Sun J.W., Kim J.Y., Lee I. // Food Sci. Biotechnol. 2008. V. 17. № 5. P. 1021–1024.
14. Yang S.Q., Wang L.J., Yan Q.J., Jiang Z.Q., Li L.T. // Food Chem. 2009. V. 115. № 4. P. 1247–1252.
15. Zechel D.L., Boraston A.B., Gloster T., Boraston C.M., Macdonald J.M., Tilbrook D.M.G., Stick R.V., Davies G. // J. Am. Chem. Soc. 2003. V. 125 P. 14313–14323.

16. Henrissat B., Bairoch A. // Biochem J. 1996. V. 316. P. 695–696.
17. Keresztessy Z., Brown K., Dunn M.A., Hughes M.A. // Biochem. J. 2001. V. 353. P. 199–205.
18. Kaper T., Heusden H.H.V., Loo B.V., Vasella A., Oost J.V.D., Willem M.D.V. // Biochemistry. 2002. V. 41. P. 4147–4155.
19. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. // Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
20. Miller G. // Analyt. Chem. 1959. V. 31. P. 426–428.
21. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1967. V. 72. P. 248–254.
22. Goyal K., Kim B.J., Kim J.D., Kim Y.K., Kitaoka M., Hayashi K. // Arch. Biochem. Biophys. 2002. V. 407. P. 125–134.
23. Lebbink J.H.G., Kaper T., Bron P., John O., Willem M.V. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 3656–3665.
24. Li Y., Kitaoka M., Hayashi K. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2004. V. 68. № 5. P. 1113–1118.
25. Berrin J.G., Czjzek M., Kroon P.A., Mclauchlan W.R., Puigserver A., Williamson G.J.N. // Biochem. J. 2003. V. 373. P. 41–48.

Residues Affecting Hydrolysis of Soy Isoflavone Glycosides, Stability and Catalytic Properties of *Thermotoga maritime* β -glucosidase¹

Y. Xue^a, X. Song^b, H. Sun^b, and Z. Cao^c

^a Department of Food Science and Nutrition, GinLing College, Nanjing Normal University, Nanjing, PR China 210097

^b College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing, PR China 210023

^c Urology Surgery, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, PR China 210006

e-mail: caozhigang11@sina.com; xueyemin@njnu.edu.cn

Received October 15, 2012

Abstract—The thermostable β -glucosidase A (TmBglA) from *Thermotoga maritime* is a promising biocatalyst for production of isoflavone aglycones. Use of enzymes with high specificity for soy isoflavone conjugates is however essential for efficient hydrolysis. The effect of the amino acids located in the aglycone binding pocket with non-conserved residues between specificity groups in family 1 glycoside hydrolase (GH1) was studied using wild-type TmBglA and 3 exchange mutants (M1-TmBglA, M2-TmBglA, M1M2-TmBglA). Three mutants were expressed in *Escherichia coli*, purified and characterized. They had shifts in both optimum temperature and thermal stability, and their narrowing pH-activity curve caused by removing the ionized side chain in mutation. All mutants demonstrated the decreased catalytic efficiency more effectively revealed with natural glycoside, salicin, than with artificial substrate, *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, suggesting that these amino acids are the key residues to determine aglycone specificity. A lower hydrolysis of genistin and daidzin for M2-TmBglA than M1-TmBglA indicated that L400, A407 and E408 being preferable to V170, A171, V173, G174 and H180 residues of Tm-BglA could be essential for soy isoflavone glycoside binding and catalysis.