



УДК 577.151.4

Влияние газовых сред на субстратную специфичность и физико-химические свойства хроматографически очищенной адсорбированной β -глюкозидазы растений гороха

Ершова А.Н., Фатуллаева А.С.

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный педагогический университет», Воронеж

Поступила в редакцию 16.04.2012 г.

Аннотация

Получены высокоочищенные препараты адсорбированной на клеточной стенке β -глюкозидазы растений гороха, подвергнутых кратковременному воздействию гипоксии и CO_2 -среды. Путем высаливания сульфатом аммония и гель-хроматографии на G-25 достигнута степень очистки фермента 22,3 из растений, находящихся в условиях гипоксии и 47,6 - в условиях CO_2 -среды. Показано, что действие на проростки гипоксии и высоких концентраций диоксида углерода не изменяло скорости элюции фермента при хроматографической очистке на колонке. При нормальной аэрации растений фермент с наибольшей скоростью расщеплял специфический изосукцинимид- β -гликозид и р-НФГ и не расщеплял галактопиранозиды с α - и β -связями. CO_2 -среда увеличивала сродство фермента ко всем субстратам, включая и УДФ-глюкозу. В условиях дефицита кислорода и CO_2 -среды увеличивалась стабильность фермента проростков по отношению к пероксиду водорода и отмечался сдвиг оптимума pH с 4,8 до 4,6. Установлено наличие существенных различий адсорбированной на клеточной стенке β -глюкозидазы от цитоплазматической растений гороха по физико-химическим свойствам.

Ключевые слова: β -глюкозидаза, адсорбированная, клеточная стенка, горох, хроматографическая очистка, свойства, гипоксия

Highly purified preparation of cell wall adsorbed β -glucosidase of pea plants exposed to short term hypoxia and CO_2 -media received. By salting with ammonia sulfate and gel chromatography on G-25 the achieved purification rate for enzyme was 22.3 for plants under hypoxia and 47.6 for under CO_2 -media. It was shown that seedlings under hypoxia and high concentrations of carbon dioxide had no changes in elution rate of enzyme under chromatographical purification on the column. Under normal plant aeration the enzyme resolved specific isosuccinimide β -glycoside (IS-glycoside), p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) and did not resolve galactopyranosides with α - and β -bonds. In contrast CO_2 -media increased affinity of enzyme to all substrates including uridine diphosphate glucose (UDPG). It was noted that under oxygen deficit and CO_2 -media the enzyme stability of seedlings increased towards hydrogen peroxide and shift of pH optima from 4.8 to 4.6 was observed. Presence of significant differences in variety of physicochemical properties for cell wall adsorbed and cytoplasmic β -glucosidase of pea seedlings was shown.

Keywords: β -glucosidase, cell wall, pea, chromatographical purification, properties, hypoxia

Введение

β -Глюкозидазы – относятся к классу гидролаз (КФ 3.2.1. 21), катализирующих гидролиз β -глюкозидной связи между двумя остатками гликона или связи между глюкозой и алкил- или арилагликоном [1]. Ферменты широко распространены среди микроорганизмов, животных и растений [2,3]. У высших растений β -глюкозидазы

разделены на несколько групп, которые определяют на основе различий в расщепляемых ими субстратах. При этом встречаются как высокоспецифические ферменты, расщепляющие только определенные субстраты, так и расщепляющие широкий спектр данного типа соединений [4]. β -Глюкозидазы могут локализоваться в различных компонентах растительной клетки, включая цитоплазму, вакуоли и фракции клеточных стенок [5]. Показано, что связанные с клеточной стенкой β -глюкозидазы участвуют в разрушении олигосахаридов, образующихся при действии эндо- β -глюканаза, а также в защите растений от фитопатогенных микроорганизмов [6]. Обнаружено, что β -глюкозидазы увеличивают свою активность в период роста растений, индуцированного ауксинами [7]. Указывают также на связь между активностью этих ферментов и растяжимостью клеточной стенки растений [8].

В проростках гороха [5] была обнаружена β -глюкозидаза, которая представлена не только цитоплазматической, но и связанными с клеточными стенками молекулярными формами фермента, различающихся по ряду физико-химических свойств. Показано, что их активность менялась в ходе онтогенеза растений гороха [5] и при действии гипоксии [1]. Исследовали физико-химические свойства, включая субстратную специфичность, влияние pH и пероксида водорода на хроматографически очищенный препарат адсорбированной на клеточных стенках β -глюкозидазы растений гороха, находящихся в условиях разных газовых сред.

Эксперимент

Ферментные препараты выделяли из листьев 10-дневных проростков гороха (Рамонский 77), выращенных гидропонным методом на свету. Проростки без корней и семядолей помещали в различные газовые среды: воздух, азот и CO_2 (коммерческий из баллонов), которые пропускали через затемненные вакуум-эксикаторы в течение 24 часов [1]. Адсорбированную на клеточных стенках β -глюкозидазы выделяли с помощью разработанной схемы [5], которая включала двух кратную обработку 0,1 М фосфатно-цитратным буфером pH 6,0, высаливание белковой фракции сульфатом аммония и дальнейшую очистку фермента гелехроматографией на колонке с G-25 (1,0×25 см). Все операции по выделению и очистке фермента проводили при 4°C.

В качестве субстратов для фермента использовали различные природные и синтетические арилглюкопиранозиды и дисахариды (0,5-10 мМ). Активность β -глюкозидазы определяли по количеству отщепившейся глюкозы, содержание которой рассчитывали глюкооксидазным методом [10], в случае *p*-НФГ - по *p*-нитрофенолу [11]. Оптическую плотность растворов измеряли на СФ-56 (Россия). Удельную активность фермента выражали в Е на мг белка, который определяли по Лоури или по поглощению $\lambda=260$ нм. Кинетические параметры (K_m , V_{max}) рассчитывали по Лайнуиверу-Берку [9]. Все опыты проводили в 2-кратной биологической и аналитических повторностях. В работе приведены данные типичных опытов.

В работе использовали *p*-НФГ, салицин, β -гентиобиоза, УДФ-глюкоза, *p*-НФ- α -D- и β -D- галактопиранозиды, фирмы "Sigma" (США), сефадекс G-25 фирмы "Pharmacia" (Швеция), остальные реактивы марок ч.д.а. – отечественные.

Обсуждение результатов

Препараты адсорбированной β -глюкозидазы растений, подвергшихся воздействию газовых сред, поэтапно выделяли и очищали по приведенной схеме, что позволило получить хроматографически очищенные формы фермента, которые в дальнейшем и использовали для исследования их физико-химических свойств. На рис. 1 приведены типичные кривые элюции ферментных препаратов с колонок G-25. Как видно из приведенных кривых, нахождение растений в условиях дефицита кислорода и CO_2 -среды не влияло как на объемы, так и на скорость элюции ферментного препарата с хроматографической колонки. При выделении (таблица 1) был получен ферментный препарат адсорбированной β -глюкозидазы из аэрируемых растений со степенью очистки 20,9 и удельной активностью 303,1 Е/мг белка. С такой же активностью был получен и ферментный препарат из растений, подвергшихся действию гипоксии.

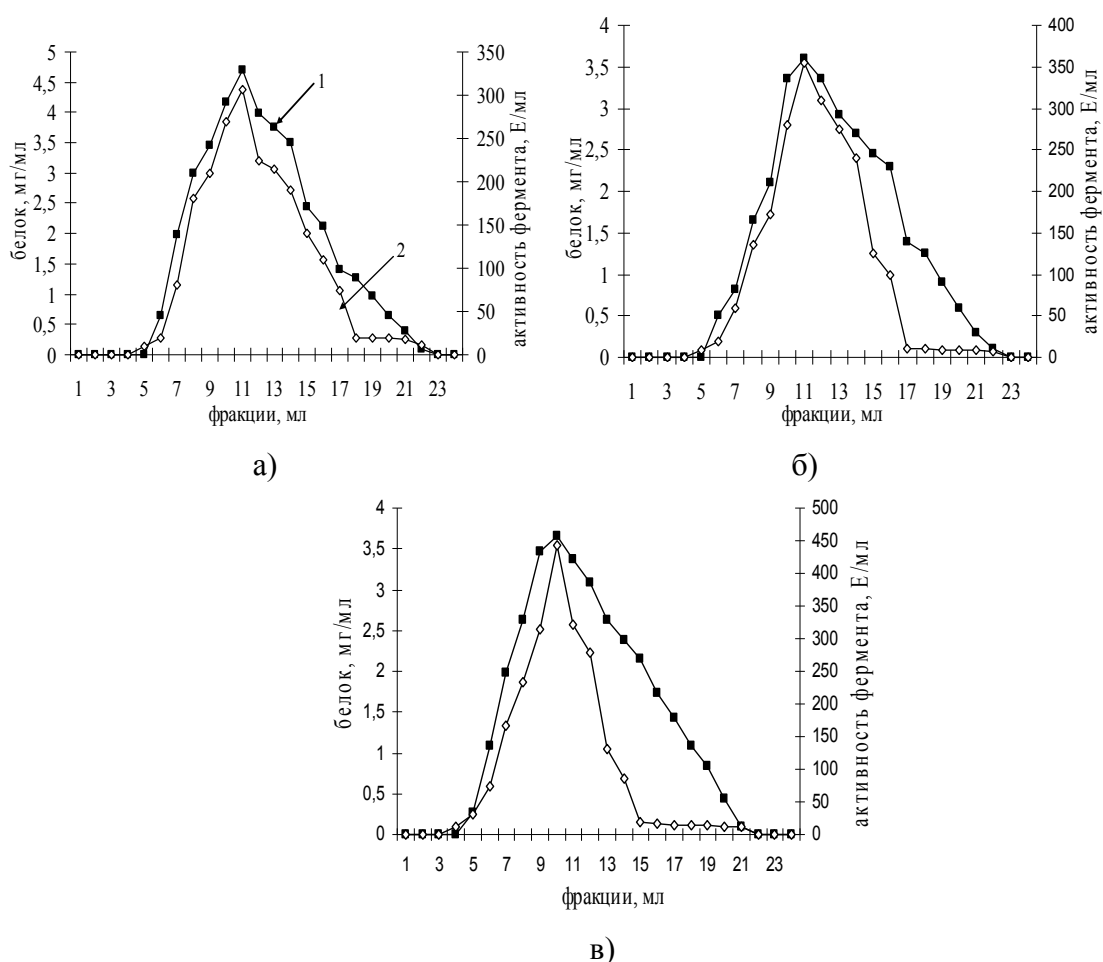


Рис.1. Кривые элюции 0,1 М фосфатно-цитратным буфером (рН 4,8) адсорбированной β -глюкозидазы с колонки G-25, выделенных из растений подвергнутых действию газовых сред (а-воздух, б-гипоксия, в- CO_2 -среда; 1-белок; 2-активность фермента)

Однако удалось достигнуть более высокую степень очистки (47,6) и получить препарат с удельной активностью более чем в два раза выше из растений, если они находились в условиях CO_2 -среды. Известно [12], что диоксид углерода в высоких концентрациях существенно влияет как на активность, так и на свойства различных ферментов.

Таблица 1. Стадии очистки адсорбированной β -глюкозидазы проростков гороха, подвергнутых действию разных газовых сред

Стадия очистки	Вариант	Активность (Е)	Количество белка (мг)	Удельная активность (Е/мг)	Степень очистки
Гомогенат	воздух	664.2±5.4	45.8±0.1	14.5±0.1	1
	гипоксия	648.6±3.7	39.8±0.7	16.3±0.2	1
	СО ₂ -среда	575.2±7.1	42.5±0.3	13.5±0.1	1
Фракционирование сульфатом аммония (60-100%)	воздух	583.7±11.2	20.5±0.1	29.5±0.6	2
	гипоксия	562.5±4.8	26.4±0.2	21.3±0.02	1.3
	СО ₂ -среда	464.1±6.3	17.9±0.5	25.9±0.3	1.9
Гель-фильтрация на G-25	воздух	515.4±5.8	1.7±0.4	303.1±54.9	20.9
	гипоксия	436.3±6.4	1.2±0.6	363.6±117.7	22.3
	СО ₂ -среда	385.7±8.2	0.6±0.3	642.8±205.1	47.6

Полученные хроматографически очищенные ферментные препараты использовали для определения субстратной специфичности β -глюкозидазы в присутствии природных и синтетических субстратов. В качестве природных субстратов выступали: изосукцинимид- β -гликозид (ИС-гликозид), УДФ-глюкоза, целлобиоза, β -гентиобиоза, салицин. К синтетическим отнесли соединения с α - или β -гликозидной связью, типа *p*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид (*p*-НФГ; связь 1→6), а также *p*-нитрофенил- α -D-галактопиранозид или *p*-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (связь 1→6). В табл. 2 приведена активность адсорбированной β -глюкозидазы растений гороха в присутствии различных субстратов. С наибольшей скоростью как показали опыты β -глюкозидаза расщепляла специфический для растения гороха ИС-гликозид, агликоном которого служит циклическое производное гамма-аминомасляной кислоты [12]. Подобная высокая скорость расщепления ИС-гликозида была ранее показана [10] и для цитоплазматической β -глюкозидазы гороха. Фермент расщеплял с достаточно высокой скоростью также и дисахариды, такие как целлобиоза и β -гентиобиоза, в которых остатки моносахаридов были связаны 1→4, 1→6 β -связью. Скорость расщепления салицина, *p*-НФ- α -D-галактопиранозид и *p*-НФ- β -D-галактопиранозид была самой низкой из этого типа соединений. Это указывает на то, что исследуемый фермент способен расщеплять широкий спектр арилглюкопиранозидов и дисахаридов, но только с β -гликозидной связью, что совпадает с данными для β -глюкозидазы из растений риса [13].

Таблица 2. Активность адсорбированной β -глюкозидазы растений гороха по отношению к различным субстратам

Субстрат	Тип связи	Активность, %
<i>p</i> -НФ- β -D-глюкопиранозид	β -(1→6)	100
ИС-гликозид	β -(1→4)	127.9
Целлобиоза	β -(1→4)	57.9
β -гентиобиоза	β -(1→6)	50.2
УДФ-глюкоза	β -(1→4)	41.5
Салицин	β -(1→4)	13.3
<i>p</i> -НФ- α -D-галактопиранозид	α -(1→6)	0
<i>p</i> -НФ- β -D-галактопиранозид	β -(1→6)	0

При действии газовых сред на растения менялись не только активность фермента по отношению к разным субстратам, но и физико-кинетические характеристики ферментных препаратов, включая K_m и V_{max} . Как видно из полученных результатов (табл. 3), при действии на растения CO_2 -среды отмечалось снижение величины K_m для β -глюкозидазы по отношению ко всем проанализированным природным и синтетическим субстратам.

Таблица 3. Влияние газовых сред на кинетические характеристики адсорбированной β -глюкозидазы растений

Субстрат	K_m , мМ			V_{max} мкМ/мин		
	Воздух	Гипоксия	CO_2 -среда	Воздух	Гипоксия	CO_2 -среда
Арилглюкопиранозиды						
p-НФГ	0.82	0.79	0.65	32.27	33.38	36.39
ИС-гликозид	0.32	0.31	0.27	41.28	42.36	45.61
Салицин	4.17	3.53	3.49	5.28	6.49	6.78
дисахариды						
В-гентиобиоза	3.14	2.36	1.25	16.15	22.43	28.76
Целлобиоза	3.28	2.96	2.31	18.74	20.85	22.61
УДФ-глюкоза	2.39	2.26	1.31	13.43	15.16	21.43

В тоже время при действии гипоксического стресса на растения снижение величины K_m для фермента было наиболее существенным по отношению к салицину и β -гентиобиозе. В отношении других субстратов оно было менее выраженным. Это позволяет предположить, что в условиях дефицита кислорода как арилглюкозиды, так и дисахариды могут стать источником глюкозы для процессов дыхательного метаболизма растений, скорость и направление которых значительно меняются у них при гипоксии [12].

Известно, что в условиях дефицита кислорода в клетках растений меняется содержание разных типов АФК, включая и пероксид водорода [14]. Предполагается, что пероксид водорода, как один из самых стабильных продуктов АФК влияет не только на активность ферментов, но может выступать наряду, с Ca^{2+} в качестве вторичного мессенджера в восприятии сигналов о быстро меняющейся концентрации кислорода в окружающей среде [8]. В связи с этим исследовали влияние различных концентраций пероксида водорода на активность фермента, который выделяли из растений, подвергшихся воздействию гипоксии и CO_2 -среды. Как показали наши исследования (рис. 2), присутствие в среде пероксида водорода даже в низкой концентрации, снижало активность β -глюкозидазы почти в двое.

При увеличении концентрации пероксида водорода до 1 мМ активность фермента падала на 70%. Дальнейшее возрастание его содержания в среде инкубации уже вызывало почти полную инактивацию фермента. В условиях гипоксического стресса и действии CO_2 -среды происходили значительные изменения не только кинетических характеристик β -глюкозидазы, но и ее стабильности в присутствии высоких концентраций пероксида водорода. Активность фермента падала после действия гипоксии на растения в присутствии 1 мМ пероксида водорода только на 60%, а в CO_2 -среде - на 55%.

Известно [12], что в условиях гипоксии у растений происходит снижение внутриклеточного рН за счет накопления различных недоокисленных продуктов. В связи с этим изучили активность фермента при разных значениях рН у растений,

подвергшихся действию дефицита кислорода и CO_2 -среды. Ранее было показано [1], что при действии гипоксии у растений гороха для цитоплазматической формы β -глюкозидазы происходил сдвиг оптимума pH с 5,6 до 5,3. Как показали наши опыты (рис.3) подобный сдвиг оптимума pH наблюдался и для адсорбированной β -глюкозидазы растений гороха. При действии гипоксии оптимум pH фермента растений составил 4,6, а для CO_2 -среды – 4,7.

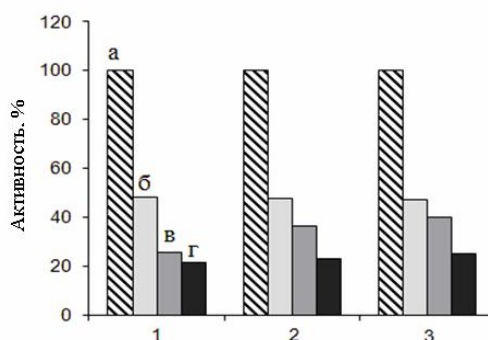


Рис. 2. Влияние пероксида водорода на активность хроматографически очищенной адсорбированной β -глюкозидазы растений гороха, подвергнутых действию разных газовых сред (1-воздух; 2-гипоксия; 3- CO_2 -среда); а - контроль, б-0,5 мМ, в-1,0 мМ, г-1,5 мМ H_2O_2

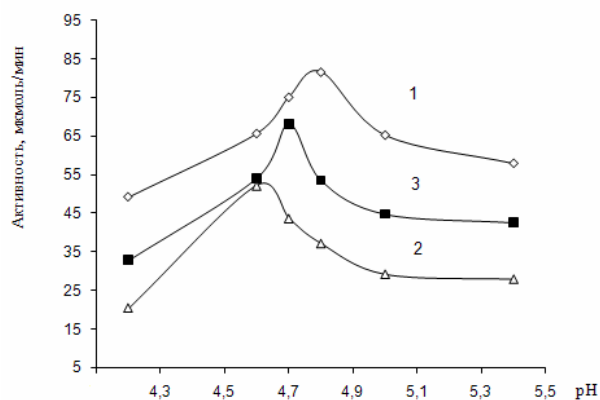


Рис. 3. Влияние pH на активность β -глюкозидазы растений гороха в условиях разных газовых сред (1 - воздух, 2 - гипоксия, 3 - CO_2 -среда)

Заключение

В результате проведенных исследований впервые было изучено влияние разных газовых сред на физико-химические свойства высокоочищенной адсорбированной на клеточной стенке β -глюкозидазы растений гороха. Показано, что действие на растения условий кратковременной гипоксии и CO_2 -среды не изменяло скорости элюции фермента при хроматографической очистке на G-25, что свидетельствовало о сохранении размеров и молекулярной массы фермента растений в этих условиях. В тоже время отмечалось изменение скорости расщепления выделенными препаратами β -глюкозидазы дисахаридов и арилгликозидов. При действии гипоксии на растения обнаружено повышение активности фермента по отношению к β -гентиобиозе, целлобиозе и, особенно салицину. В этих условиях изменялись и кинетические параметры фермента, такие как K_m и V_{max} . Величина K_m фермента имела более низкие значения в условиях аэрации для ИС-гликозида и р-НФГ, что свидетельствовало о высокой специфичности адсорбированной β -глюкозидазы к данным субстратам. Эта же закономерность наблюдалась и для цитоплазматической формы фермента [1]. Однако, адсорбированная β -глюкозидаза с меньшей скоростью расщепляла салицин. Анализ изменения величины K_m фермента по отношению к разным субстратам позволяет заключить, что для адсорбированной β -глюкозидазы в стрессовых условиях происходят определенные конформационные

изменения, затрагивающие активный центр данного фермента, как предполагалось ранее [5]. Обнаружено, что в условиях CO_2 -среды оптимум pH фермента оставался на уровне аэрируемых растений в отличие от условий гипоксии, где он снижался с 4,8 до 4,6. CO_2 -среда в большей степени, чем гипоксический стресс, увеличивала стабильность фермента к высоким концентрациям пероксида водорода, который накапливался при этих условиях в клетках растений. Полученные данные подтверждают высказанное ранее предположение [5] о специфичности воздействия диоксида углерода на метаболические процессы растений, которое не связано со сдвигом pH, а является следствием воздействия его на ферментные системы клеток. В тоже время вызванные CO_2 -средой изменения в субстратной специфичности фермента, его кинетических параметров (K_m , V_{max}), степени влияния пероксида водорода на активность, в том числе трансгликозидазную активность [9], показали существенные отличия адсорбированной β -глюкозидазы растений гороха от ее цитоплазматической молекулярной формы. Это позволяет предположить выполнение разных функций этими молекулярными формами фермента, которые и проявляются в стрессовых условиях.

Список литературы

1. Ершова А.Н., Баркалова О.Н. Выделение, хроматографическая очистка и свойства β -глюкозидазы растений гороха, подвергнутых воздействию гипоксии и CO_2 -среды // Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т.9. Вып.5. С. 714-721.
2. Gerardi C., Blando F., Santino A., Zacheo G. Purification and characterisation of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit // Plant Science. 2001. Vol. 160. P. 795-805.
3. Kazuhiro I., Kouichi T., Hitoshi K., Hitoshi S., Kiyoshi I. Purification and characterization of extracellular and cell wall bound β -glucosidases from *Aspergillus kawachii* // Biosci., Biotechnol. and Biochem. 1998. Vol. 62. P. 1938-1946.
4. Labavitch J.M. and Ray P.M. Turnover of cell wall polysaccharides in elongating pea stem segments // Plant Physiol. 1974. Vol.53. P. 669-673.
5. Ершова А.Н., Гущина Н.А. Выделение клеточносвязанных форм β -глюкозидазы проростков гороха, их очистка и изменение в онтогенезе // Сорбционные и хроматографические процессы. 2003. Т.3. Вып.6. С. 758-766.
6. Туран Ю., Женг М. Очистка и характеристика внутриклеточной β -глюкозидазы мейлотрофных дрожжей *Pichia pastoris* // Биохимия. 2005. Т.16. Вып.2. С. 322-325.
7. Verdoucq L., Moriniere J., Bevan D.R., Esen A., Vasella A. Structural determinants of substrate specificity in family 1 beta-glucosidases. Novel insights from the crystal structure of sorghum dhurrinase-1, a plant beta-glucosidase with strict specificity, in complex with its natural substrate // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. №30. P. 31796-31803.
8. Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка как динамическая система, М: Наука, 2007, 429 с.
9. Ершова А.Н., Баркалова О.Н., Фатуллаева А.С. Влияние гипоксии и CO_2 -среды на трансгликозидазную активность цитоплазматической и связанных с клеточной стенкой молекулярных форм β -глюкозидазы растений гороха // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. 2011, №2. С. 88-91.
10. Винокурова Н.В., Ершова А.Н. Очистка, физико-химические свойства β -глюкозидазы растений гороха // Теория и практика сорбционных процессов. 2000. С. 251-257.

-
11. Захарова Н.С., Петрова Т.А. β –глюкозидазы листьев и корнеплодов столовой свеклы *Beta vulgaris* // Прикладная биохимия и микробиология. 2000. Т.36, №4. С. 458-461.
 12. Ершова А.Н. Метаболическая адаптация растений к гипоксии и повышенному содержанию диоксида углерода. – Воронеж: ВГУ. 2007. 264 с.
 13. Takashi A., Hanae K., Naoto S. A cell wall-bound β –glucosidase from germinated rice: purification and properties // Phytochemistry. 1997. Vol. 48. P. 49-54.
 14. Ершова А.Н., Попова Н.В., Бердникова О.С. Продукция активных форм кислорода и антиоксидантные ферменты растений гороха и сои при гипоксии и высоком содержании CO_2 в среде // Физиология растений., 2011, Т.58, № 5, С. 1–10.
-

Ершова Антонина Николаевна – заведующая кафедрой биологии растений и животных, доктор биологических наук, профессор, Воронежский государственный педагогический университет, Воронеж

Фатуллаева Айнур Садулла кызы – аспирант 2 года обучения кафедры биологии растений и животных Воронежский государственный педагогический университет, Воронеж

Ershova Antonina N. – Head of Plant and Animal Biology Department, Doctor of Biology, Professor, Voronezh State Pedagogical University, email: aershova@vspu.ac.ru

Fatullaeva Aynur S. – 2nd year post-graduate student, Department of Plant and Animal Biology, Voronezh State Pedagogical University, Voronezh