



УДК 581.13

## Выделение, хроматографическая очистка и свойства $\beta$ -глюкозидазы растений гороха, подвергнутых воздействию гипоксии и $\text{CO}_2$ -среды

Ершова А.Н., Баркалова О.Н.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный педагогический университет», Воронеж

Поступила в редакцию 23.07.2009 г.

### Аннотация

Разработана схема получения высокоочищенных препаратов  $\beta$ -глюкозидазы проростков гороха, подвергнутых воздействию кратковременной гипоксии и  $\text{CO}_2$ -среды. Путем высаливания сульфатом аммония и гель-хроматографии на G-25 и G-100 получены электрофоретически гомогенные препараты цитоплазматической формы фермента. Показано, что действие на проростки гипоксии и высоких концентраций диоксида углерода не изменяло скорости элюции  $\beta$ -глюкозидазы при хроматографическом разделении на колонке с G-100 и не отражалось на электрофоретической подвижности фермента. Величины  $R_f$  для всех трех форм фермента, выделенных из растений, находящихся в условиях разных газовых сред составляло 0,39. С помощью высокоочищенных препаратов  $\beta$ -глюкозидазы впервые установлено, что в условиях гипоксического стресса изменялась активность фермента по отношению к расщепляемым гликозидам. Она возрастала при использовании салицина и изосукцинимид- $\beta$ -D-гликозида (ИС-гликозида), но снижалась в отношении *p*-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозида (*p*-НФГ) и  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозида, что отразилось на кинетических характеристиках  $\beta$ -глюкозидазы ( $K_m$  и  $V_{max}$ ). При всех сроках действия гипоксии на растения величина  $K_m$  фермента снижалась для салицина, а по отношению к ИС-гликозиду, *p*-НФГ,  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозиду – возрастала.  $\text{CO}_2$ -среда вызывала увеличение  $K_m$  для всех субстратов, за исключением *p*-НФГ. Показано, что при дефиците кислорода у растений менялся оптимум pH  $\beta$ -глюкозидазы, который сдвигался с 5,6 до 5,3.

**Ключевые слова:**  $\beta$ -глюкозидаза, горох, хроматографическая очистка, свойства, гипоксия

Purification scheme for  $\beta$ -glucosidase of pea seedlings exposed to short-term hypoxia and  $\text{CO}_2$ -media was developed. By sulphate ammonium desalting and G-25 and G-100 gel chromatography the electrophoretically homogeneous samples of enzyme cytoplasmic form were obtained.

It was shown that hypoxia and high concentrations of carbon dioxide did not change the  $\beta$ -glucosidase elution speed under chromatographic separation on G-100 and did not affect electrophoretic enzyme mobility. The  $R_f$  values for all three forms of enzyme extracted from plants being under different gas media was 0.39. By means of  $\beta$ -glucosidase high-purity samples it was first discovered that under hypoxic stress the enzyme activity was changing compare to decomposed glycosides. It was increasing under usage of salicin and isosuccinimide- $\beta$ -D-glycoside (IS-glycoside), but it was decreasing towards *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*-NPG) and  $\alpha$ -methyl-D-glucopyranoside that affected kinetic characteristics of  $\beta$ -glucosidase like  $K_m$  and  $V_{max}$ . Under all periods of hypoxia exposition on plants the  $K_m$  of enzyme for salicin was decreasing, but towards other substrates like IS-glycoside, *p*-NPG,  $\alpha$ -methyl-D-glucopyranoside it was increasing.  $\text{CO}_2$ -media induced an increase of  $K_m$  for all the substrates except *p*-NPG. It was shown that under oxygen deficit in plants the pH optimum for  $\beta$ -glucosidase was also varying from 5.6 to 5.3.

**Key words:**  $\beta$ -glucosidase, pea, chromatographic purification, properties, hypoxia

### Введение

$\beta$ -Глюкозидаза ( $\beta$ -D-глюкозид-глюкогидролаза, КФ 3.2.1.21), катализирует гидролитическое расщепление  $\beta$ -гликозидной связи между двумя остатками гликона или связи между глюкозой и алкил- или арилагликоном. Фермент составляет основную группу среди гликозидгидролаз, выделенных из представителей всех трех царств живых организмов, однако в меньшей степени изучен в растениях.  $\beta$ -Глюкозидазы могут локализоваться в различных компартментах растительной

клетки, так, расщепляющие салицин (в листьях овса, кукурузы, фасоли, подсолнечника, картофеля) присутствовали в основном во фракции клеточных стенок [12] или могут быть локализованы в цитоплазме или в вакуоле, где находятся расщепляющиеся ими гликозиды [10].

Физиологические функции растительных  $\beta$ -глюкозидаз разнообразны. Они участвуют в процессах активации/деактивации фитогормонов [11], в синтезе веществ клеточных стенок, в процессах лигнификации, а также в расщеплении транспортных форм  $\beta$ -D-гликозидов [14].  $\beta$ -Глюкозидаза диоскореи катализировала превращение фураностаноловых гликозидов в спиростаноловые, которые обладали фунгицидной и антибактериальной активностями, что обеспечивало защиту растений от фитопатогенных микроорганизмов [2].

Растительные глюкозидазы обычно проявляют максимальную активность при кислых значениях pH (4-6) и температуре 30-50°C [1; 6-8;13]. Ранее нами [1] в проростках гороха была обнаружена  $\beta$ -глюкозидаза, расщепляющая специфический изосукцинимид- $\beta$ -гликозид (ИС-гликозид), предшественником агликона которого является циклическое производное  $\gamma$ -аминомасляная кислота (ГАМК). Было показано, что существуют цитоплазматическая и клеточносвязанная молекулярные формы фермента. Активность их менялась в ходе онтогенеза [4] и гипоксии [5]. Однако для исследования влияния факторов внешней среды на свойства фермента необходимо было получить высокоочищенные препараты  $\beta$ -глюкозидазы из растений. В связи с этим, целью данной работы было разработать методику и получить высокоочищенные препараты фермента из растений, подвергнутых воздействию гипоксии и CO<sub>2</sub>-среды, и изучить их свойства, включая субстратную специфичность, кинетические характеристики и pH-оптимум.

## Материалы и методы

Объектом исследования служили листья 10-дневных проростков гороха (*Pisum sativum*) сорта "Рамонский 77", выращенные гидропонным методом на свету (1000 люкс/см<sup>2</sup>) при +20°C. Проростки гороха подвергались воздействию разных газовых сред: воздух, гипоксия и углекислый газ (6-24ч). Навеску листьев (15 г) растирали в ступке с 0,05 М фосфатно-цитратным буфером pH 7,0, содержащим 0,4 М сахарозу и 0,01 М фосфат калия в соотношении 1:4. Гомогенат отжимали через капроновую ткань и центрифугировали (30 мин., 8000 об/мин) для отделения неразрушенных клеток и их крупных фрагментов. Надосадочную жидкость насыщали серноокислым аммонием (60-90 %). Полученную после высаливания фракцию для удаления низкомолекулярных примесей пропускали через колонку (1,0×34 см) с G-25, уравновешенную фосфатно-цитратным буфером (pH 5,6) со скоростью 20 мл/час по 1 мл. Обессоленную фракцию наносили на колонку (1,5×30 см) с сефадексом G-100, предварительно уравновешенную тем же буфером. Собирали фракции по 1 мл при скорости элюции 8 мл/час. Все операции по выделению и очистке фермента проводили при 4°C.

При определении активности в качестве субстратов использовали природные (салицин, ИС-гликозид) и синтетические (p-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозид (p-НФГ),  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид) гликозиды (0,5-10 мМ). Активность  $\beta$ -глюкозидазы определяли по количеству освободившейся при гидролизе субстратов глюкозы, а для p-НФГ по количеству отщепившегося p-нитрофенола [8]. Количество глюкозы в пробе определяли глюкооксидазным методом [1].

Оптическую плотность растворов измеряли на СФ-56 (Россия). За единицу активности  $\beta$ -глюкозидазы принимали количество фермента, катализирующего расщепление 1 мкмоль субстрата в мин при 37°C. Удельную активность выражали в Е на мг белка. Белок определяли по Лоури или по поглощению при  $\lambda = 260$  нм. Определение  $K_m$  проводили методом двойных обратных величин по Лайуниверу-Берку [3].

Чистоту выделенного фермента контролировали электрофоретическим методом. Неденатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле проводили по Davis [13]. Разделяющий гель содержал Трис-НСI pH 8,9, ТЕМЕД, акриламидную смесь, персульфат аммония. Концентрирующий гель содержал Трис-НСI pH 6,7, ТЕМЕД, акриламидную смесь, рибофлавин, сахарозу. Концентрация концентрирующего геля составляла 2,5%, а разделяющего 7,5%. Идентификацию белка проводили нитратом серебра. Электродный буфер представлял собой смесь 0,5 М Трис-глицинового буфера pH 8,3. Напряжение электрического тока подбиралась из расчета 2 мА на 1 слот.

Все опыты проводили в 3-кратной биологической повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. В работе приведены данные типичных опытов.

## Результаты и обсуждение

Для получения высокоочищенного ферментативного препарата цитоплазматической  $\beta$ -глюкозидазы растений гороха, подвергнутых воздействию разных газовых сред (6-24 ч), была проведена многостадийная очистка растительного гомогената. Результаты типичной очистки представлены в таблице 1. Фермент, выделенный из аэрируемых растений, был очищен в 80,7 раз с выходом 16,2 %.  $\beta$ -Глюкозидаза, выделенная из проростков гороха, подвергнутого воздействию гипоксии и  $\text{CO}_2$ -среды (6ч), была очищена в 72,8 и 74,7 раза соответственно с выходом 14,8 и 10,4 %. При увеличении сроков экспонирования проростков в условиях гипоксии до 24 часов были получены ферментативные препараты с такой же степенью очистки, которая составила 80,7 (воздух), 75,7 (гипоксия) и 72,7 ( $\text{CO}_2$ -среда).

На рис. 1 приведены кривые элюации препаратов фермента на G-100, выделенных из проростков, находящихся 6 часов в условиях разных газовых сред. Как видно из этих результатов, нахождение растений в условиях дефицита кислорода и  $\text{CO}_2$ -среды не влияло на объемы и скорость элюции препарата с колонки.

С помощью электрофореза в полиакриламидном геле было показано, что в результате предложенной схемы очистки, были выделены электрофоретически гомогенные формы ферментного препарата (рис. 2). Воздействие на растения условий гипоксии или высоких концентраций диоксида углерода не изменило электрофоретической подвижности  $\beta$ -глюкозидазы. Величины  $R_f$  для всех трех форм фермента, выделенного из растений, находящихся 6 часов в условиях разных газовых сред составило 0,39, что близко к полученным ранее [1] величинам  $R_f$  этого фермента из растений гороха.

Таблица 1. Стадии очистки  $\beta$ -глюкозидазы растений гороха, подвергнутых воздействию разных газовых сред

Стадия очистки	Вариант	Активность, Е	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	воздух	2612	167,8	15,6	100	1
	гипоксия	2463	134,4	18,3	100	1
	СО <sub>2</sub> -среда	2197	157,2	13,9	100	1
Высаливание сульфатом аммония (60-90%)	воздух	2234	87,4	25,5	85,5	1,6
	гипоксия	2145	60,6	35,4	87,1	1,9
	СО <sub>2</sub> -среда	1644	74,9	21,9	74,8	1,6
Гель-хроматография на сефадексе G-25	воздух	1595	24,9	64,1	61,1	4,1
	гипоксия	1435	18,2	78,8	58,2	4,3
	СО <sub>2</sub> -среда	1149	14,3	80,3	52,3	5,8
Гель-хроматография на сефадексе G-100	воздух	399	0,27	1477,7	16,2	80,7
	гипоксия	386	0,34	1137,0	14,8	72,8
	СО <sub>2</sub> -среда	228	0,22	1038,6	10,4	74,7

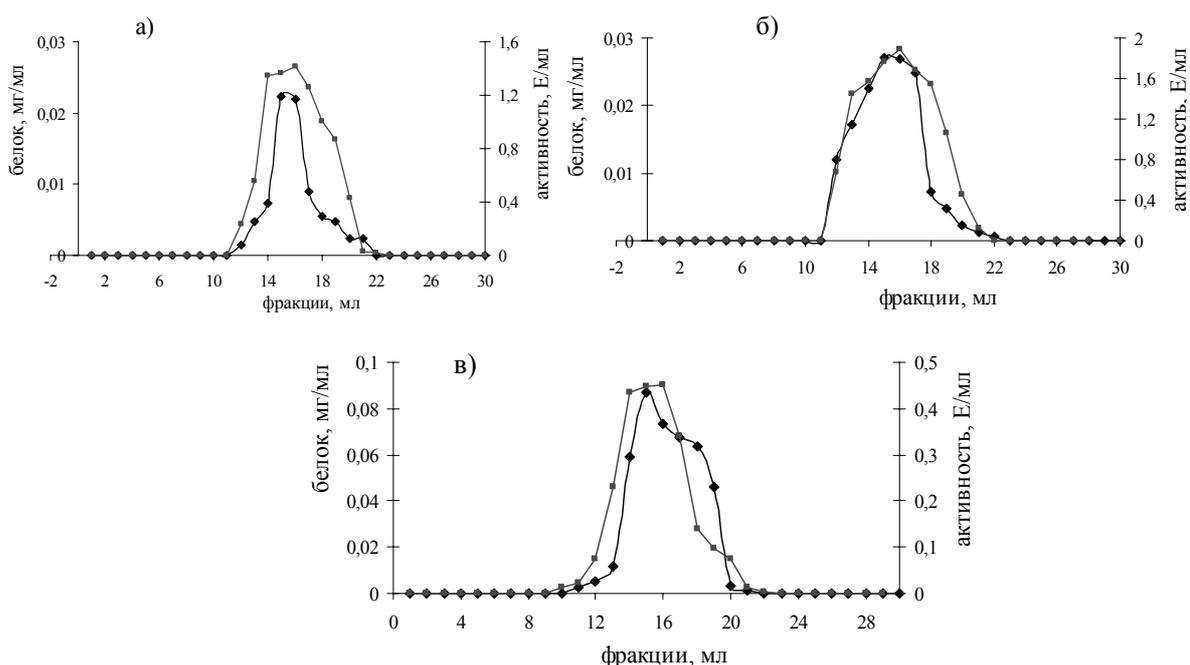


Рис. 1. Кривые элюции препарата  $\beta$ -глюкозидазы 0,1 М фосфатно-цитратным буфером (рН 5,6) с колонки G-100 из растений гороха, подвергнутых воздействию разных газовых сред (а- воздух, б- гипоксия, в-СО<sub>2</sub>-среда).

Полученные препараты  $\beta$ -глюкозидазы использовались для определения субстратной специфичности и активности фермента в зависимости от условий аэрации. Как показывают данные таблицы 2, в первые шесть часов активность  $\beta$ -глюкозидазы растений гороха, подвергнутых действию гипоксического стресса, возрастала для природных гликозидов, таких как салицина в 2,7 раза, а ИС-

гликозида- в 1,2 раза, но понижалась по отношению к синтетическим гликозидам: р-НФГ и  $\alpha$ -метил-D- глюкопиранозиду практически в два раза.

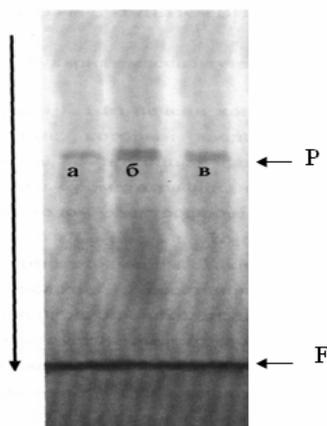


Рис. 2. Неденатурирующий электрофорез выделенного препарата  $\beta$ -глюкозидазы из проростков гороха в норме (а), при гипоксии (б) и в  $\text{CO}_2$ -среде (в).

Направление движения белка указано стрелкой.

F-фронт красителя бромфенолового синего, P-  $\beta$ -глюкозидаза.

Таблица 2. Влияние гипоксии и  $\text{CO}_2$ -среды на субстратную специфичность  $\beta$ -глюкозидазы растений гороха (Е- мкмоль/мин; %-от аэрируемого контроля)

Время, ч	Субстрат	Воздух		Гипоксия		$\text{CO}_2$ -среда	
		Е	%	Е	%	Е	%
6	Салицин	22,47	100	60,45	269,0	49,47	220,2
	р-НФГ	112	100	53,48	47,7	43,48	38,82
	$\alpha$ -метил- $\beta$ -D-глюкопиранозид	11,60	100	6,19	53,4	14,04	121,0
	ИС-гликозид	166,5	100	202,3	121,5	202,8	121,8
24	Салицин	22,47	100	27,00	120,2	27,03	120,3
	р-НФГ	112	100	13,22	11,8	24,0	21,4
	$\alpha$ -метил- $\beta$ -D-глюкопиранозид	11,60	100	7,99	68,8	12,97	118,8
	ИС-гликозид	166,5	100	175,7	105,5	175,7	105,5

С увеличением сроков экспонирования растений до 24 часов активность фермента значительно снижалась при использовании всех субстратов, за исключением салицина. По отношению к нему активность фермента оставалась выше на 20% по сравнению с контрольными растениями. При действии  $\text{CO}_2$ -среды в первые 6 часов у растений активность  $\beta$ -глюкозидазы снижалась только для р-НФГ в 2,6 раза. Для других субстратов она была выше аэрируемых растений, но только на 20-30%. Исключение составил салицин, по отношению к которому активность  $\beta$ -глюкозидазы, наоборот, возрастала до 220% от уровня аэрируемых растений. С увеличением сроков действия  $\text{CO}_2$ -среды на растения активность  $\beta$ -глюкозидазы возрастала менее значительно (20-30%) для салицина,  $\alpha$ -метил-D-глюкопиранозид, ИС-гликозида, но она понижалась для р-НФГ практически в 5 раз. В то же время активность фермента по способности расщеплять ИС-гликозид возрастала в 1,7 раза. Такой эффект повышения активности  $\beta$ -глюкозидазы в условиях  $\text{CO}_2$ -среды, при использовании ИС-гликозида в качестве субстрата, мы наблюдали и ранее [5], но только для частичноочищенной формы фермента, где активность  $\beta$ -глюкозидазы

возрастала на 30%. В нашем же опыте это происходило более значительно. Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что субстратная специфичность  $\beta$ -глюкозидазы лучше проявляется на высокоочищенных препаратах и она значительно меняется, если растения предварительно подвергались воздействию гипоксического стресса или  $\text{CO}_2$ -среды.

Было обнаружено, что в условиях разных газовых сред у растений менялась не только активность фермента, но и его кинетические характеристики, такие как  $K_m$  и  $V_{max}$ . Показано, что кинетика ферментативных реакций, катализируемых  $\beta$ -глюкозидазой растений гороха, подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Как видно из данных таблицы 3, при всех сроках действия гипоксии значение  $K_m$  фермента значительно снижалось для салицина (в 1,7 раза), но возрастала для р-НФГ,  $\alpha$ -метил- $\beta$ -D-глюкопиранозид и практически не изменялась по отношению к ИС-гликозиду.  $\text{CO}_2$ -среда вызывала возрастание величины  $K_m$  по отношению ко всем субстратам, за исключением р-НФГ. Можно предположить, что  $\beta$ -глюкозидаза растений гороха обладает более высокой специфичностью по отношению к ИС – гликозиду и р-НФГ, чем к другим субстратам. Различное воздействие газовых сред на величины  $K_m$  по отношению к исследуемым субстратам указывает на важную роль агликона в процессах расщепления гликозидной связи.

Таблица 3. Изменение  $K_m$  (мМ)  $\beta$ -глюкозидазы растений гороха, подвергнутых действию разных газовых сред

Экспозиция, ч Субстрат	6 часов			24 часа	
	воздух	гипоксия	$\text{CO}_2$ -среда	гипоксия	$\text{CO}_2$ -среда
Салицин	1,52±0,054	0,90±0,031	0,68±0,024	0,90±0,031	0,96±0,035
р-НФГ	0,62±0,015	1,05±0,043	1,01±0,065	0,87±0,040	0,77±0,054
$\alpha$ -метил- $\beta$ -D- глюкопиранозид	0,76±0,023	1,02±0,044	0,71±0,034	0,90±0,032	0,45±0,012
ИС-гликозид	0,58±0,013	0,57±0,019	0,53±0,016	0,68±0,015	0,56±0,014

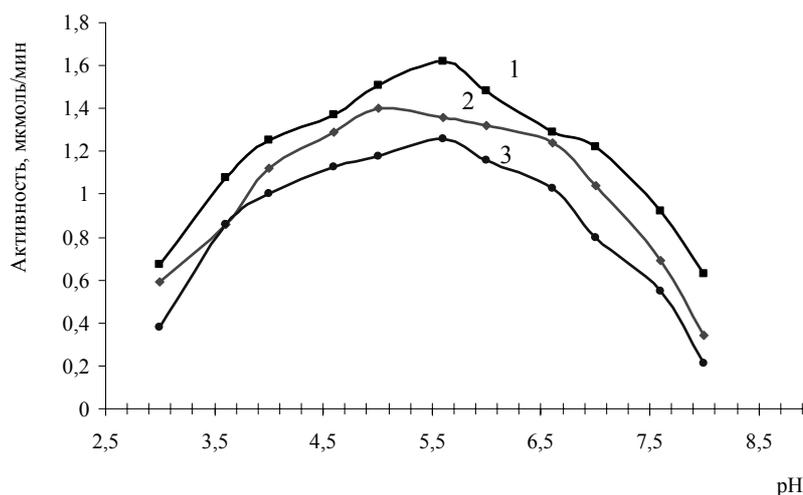


Рис. 3. Влияние pH на активность  $\beta$ -глюкозидазы растений гороха в условиях разных газовых сред (1-воздух, 2-гипоксия, 3- $\text{CO}_2$ -среда)

В опытах по изучению влияния концентрации ионов  $[\text{H}^+]$  на активность цитоплазматической  $\beta$ -глюкозидазы проростков гороха в норме, среде диоксида углерода и гипоксии, было выявлено, что фермент может функционировать в

широком интервале рН (рис.3). Однако оптимальным значением для проявления ферментативной активности  $\beta$ -глюкозидазы из контрольных растений является значение рН 5,6, что совпадает с ранее полученными результатами [1]. Следует отметить, что для фермента растений, подвергнутых гипоксическому стрессу, оптимальным является значение рН 5,3. При действии  $\text{CO}_2$ -среды на растения оптимум рН фермента практически не менялся и составил 5,5. Известно [6], что в растениях в условиях недостатка кислорода происходит накопление недоокисленных метаболитов, вызывающих снижение рН клеток и это могло вызвать сдвиг рН-оптимума фермента в область более низких значений.

## Заключение

В результате исследований была разработана методика многостадийной очистки для выделения цитоплазматической  $\beta$ -глюкозидазы из проростков гороха, подвергнутых воздействию разных газовых сред. Полученные высокоочищенные формы препаратов фермента имели одинаковую электрофоретическую подвижность с  $R_f$  0,39. Исследована активность и субстратная специфичность высокоочищенной цитоплазматической  $\beta$ -глюкозидазы проростков гороха при действии гипоксического стресса. Обнаружено повышение у растений активности фермента по отношению к природным гликозидам (салицин, ИС-гликозид), что поставляет глюкозу, необходимую для дыхательного обмена проростков в условиях дефицита кислорода. Изменялись в этих условиях и кинетические параметры  $\beta$ -глюкозидазы, такие как  $K_m$  и  $V_{max}$ . Величина  $K_m$  фермента имела более низкие значения у растений в условиях аэрации для ИС-гликозида и р-НФГ, что свидетельствует о высокой специфичности фермента к данным субстратам. Анализ изменения величины  $K_m$  фермента для различных субстратов позволяет предположить, что стрессовые условия вызывают определенные конформационные изменения  $\beta$ -глюкозидазы, затрагивающие активный центр фермента, как предполагалось ранее [10]. Выяснилось, что в условиях  $\text{CO}_2$ -среды оптимум рН фермента оставался на уровне аэрируемых растений. Полученные данные подтверждают специфичность воздействия диоксида углерода на метаболические процессы растений, которые не связаны со сдвигом рН цитоплазмы, а являются результатом воздействия на мембранные и ферментные структуры клеток [6].

## Список литературы

1. Винокурова Н.В, Ершова А.Н. Очистка, физико-химические свойства  $\beta$ -глюкозидазы растений гороха //Теория и практика сорбционных процессов: сб. науч. тр. 2000. С.251-257.
2. Гуриелидзе К.Г., Пасешниченко В.А., Васильева И.С. Гликогидролазы листьев и корневищ диоскореи дельтовидной *Dioscorea deltoidea wall*// Биохимия. 1987. Т.52. В.4. С.562-568.
3. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: в 3-х т.-М: Мир, 1982. Т.2. С.515
4. Ершова А.Н., Баркалова О.Н.  $\beta$ -Глюкозидазы растений гороха, свойства, внутриклеточная локализация, изменение в онтогенезе //IV съезд Российского об-ва биохимиков и молекул. биологов. Новосибирск, 2008.С.235

5. Ершова А.Н., Еремина Н.А. Физико-химические и кинетические свойства клеточносвязанных молекулярных форм  $\beta$ -глюкозидазы проростков гороха // Сорбционные и хроматографические процессы. 2006. Т.6. Вып.3. С.432-440
6. Ершова А.Н. Метаболическая адаптация растений к гипоксии и повышенному содержанию диоксида углерода. ВГУ, 2007.-229с.
7. Жданов, Ю.А., Кесслер Р.М., Колоколова Н.С. Система  $\beta$ -гликозидаз подсолнечника. Выделение ферментов и изучение их субстратной специфичности // Биохимия. 1980. Т.45. В.12. С.2158-2163.
8. Захарова Н.С., Петрова Т.А.  $\beta$ -Глюкозидазы листьев и корнеплодов столовой свеклы *Beta vulgaris* // Прикладная биохимия и микробиология. 2000. Т.36. №4. С.458-461.
9. Кунаева, Р.М. Гидролитические и окислительные ферменты обмена фенольных соединений растений / Наука, 1986. –158с.
10. Пасешниченко, В.А.  $\beta$ -глюкозидазы высших растений и их участие в процессах ферментации растительного сырья// Прикладная биохимия и микробиология. 1989. Т.25. В.4. С.435-449.
11. Туран Ю., Женг М. Очистка и характеристика внутриклеточной  $\beta$ -глюкозидазы метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* // Биохимия. 2005.Т. 70. Вып.12. С. 1656-1663.
12. Чкаников, Д.И., Тарабрин Г.А., Шабанова А.М. Локализация  $\beta$ -глюкозидазы в клетках высших растений // Физиология растений. 1969.Т.16. В.2. С.322-325.
13. Davis B.J. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum protein// ann. N. Y. Acad. Sci..1994. V. 121. P. 404-427
14. Sue M., Yamazaki K. Molecular and Structural Characterization of  $\beta$ -D-Glucosidases in Wheat and Rye // Plant Physiology. 2006. V.141. P.1237-1247.

---

**Ершова Антонина Николаевна** – профессор, д.бн., зав. кафедрой биологии растений и микробиологии, Воронежский государственный педагогический университет

**Ershova Antonina N.** – Voronezh State Pedagogical University, chief of biology of plant and microbiology department, doctor of biology science, professor, e-mail: [aershova@vspu.ac.ru](mailto:aershova@vspu.ac.ru)

**Баркалова Оксана Николаевна** – аспирант 3 года обучения кафедры биологии растений и микробиологии Воронежский государственный педагогический университет, - e-mail: [oks-bar@mail.ru](mailto:oks-bar@mail.ru)

**Barkalova Oksana N.** – Voronezh State Pedagogical University, post-graduate student of biology of plant and microbiology department (3-rd year), e-mail: [oks-bar@mail.ru](mailto:oks-bar@mail.ru),