



УДК 577.154

**ЗАВИСИМОСТЬ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ  
β-1,3-ГЛЮКАНАЗЫ ИЗ *SPISULA SACHALINENSIS* ОТ pH****Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н.***Тихоокеанский институт биоорганической химии  
Дальневосточного научного центра  
Академии наук СССР, Владивосток*

На основе изучения влияния pH на ферментативную активность эндо-β-1,3-глюканазы из морского моллюска *S. sachalinensis* определены константы ионизации функциональных групп активного центра. Выяснено, что каталитическая активность фермента контролируется ионизацией двух групп с  $pK_a$  6,8 и 4,0. Первая из них может быть имидазольной группой гистидина или аминогруппой, вторая — карбоксильной группой аспарагиновой или глутаминовой кислоты.

Изучение влияния pH на скорость ферментативной реакции может быть использовано для идентификации групп молекулы фермента, участвующих в каталитическом механизме [1]. Такое исследование было проведено нами для эндо-β-1,3-глюканазы (КФ 3,2,1,6, β-1,3-глюкан глюканогидролаза)—ламинариназы IV, выделенной [2] из морского моллюска *S. sachalinensis*. В работе использовали два субстрата: ламинарин (β-1,3-глюкан из *L. cycharioides* [3]) и лишенин (смешанный β-1,3- и 1,4-глюкан мха [4]) и два метода определения скорости ферментативной реакции — по нарастающему количеству восстанавливающих сахаров методом Нельсона [5] и по количеству образующейся глюкозы, определяемой глюкозооксидазным методом [6].

Активность ламинариназы IV по отношению к ламинарину и лишенину в зависимости от pH представлена на рис. 1. Кривые имеют максимум в области pH 5—6. Кривая pH-стабильности фермента представлена на рис. 2. Видно, что устойчивость фермента падает в области pH ниже 3,5 и выше 7,5, что и определило границы pH при проведении кинетических экспериментов. В исследуемом диапазоне pH кинетика ферментативной реакции подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен.

Зависимости кинетических параметров от pH представлены в логарифмических координатах на рис. 3. Значения кинетических констант, определенные при различных pH, приведены в таблице. Так как субстрат в исследуемой области pH не ионизируется, полученные данные отражают изменения в состоянии ионизации групп свободного фермента и фермент-субстратного комплекса. Логарифмическая зависимость  $V/K_m$  от pH отражает константы ионизации групп свободного фермента [7]. Определенный по рис. 3,  $b$   $pK_a$  для свободного фермента равен 6,2. Из логарифмической зависимости  $K_m$  от pH (рис. 3,  $a$ ) видно, что величина  $pK_a$  этой группы в фермент-субстратном комплексе изменяется и равна 6,8. Ве-

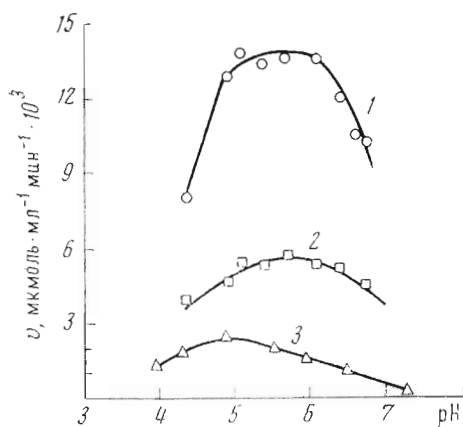


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость активности ламинариназы IV от pH для разных субстратов: 1 — ламинарин (метод Нельсона); 2 — ламинарин (глюкозооксидазный метод); 3 — лихенин (метод Нельсона)

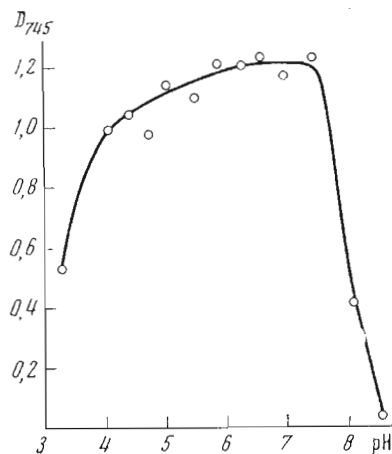


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость активности ламинариназы IV (по ламинарину, метод Нельсона) от pH предынкубации (1 ч, 37°)

личина  $pK_a$  второй группы активного центра фермента, определенная по рис. 3, равна 4,0.

Величина оптимума pH, рассчитанная по формуле

$$pH_{\text{опт}} = \frac{1}{2}(pK_a' + pK_a'') = 5,4,$$

согласуется с экспериментом (рис. 1).

Интересно сопоставить данные зависимости кинетических параметров от pH, полученные с применением разных методов определения активности фермента — по Нельсону (рис. 3) и глюкозооксидазным методом (рис. 4). Из рис. 4 видно участие группы с  $pK_a$  6,8 в образовании фермент-субстратного комплекса, но не видно участия такой группы в каталитическом

**Значения  $K_m$  и  $V$  для гидролиза ламинарина ламинариной IV при различных значениях pH\***

Определение активности по методу Нельсона [5]			Определение активности глюкозооксидазным методом [6]		
pH	$K_m \cdot 10^{-5}$ , М	$V \cdot 10^{-5}$ , М · мин <sup>-1</sup>	pH	$K_m \cdot 10^{-5}$ , М	$V \cdot 10^{-5}$ , М · мин <sup>-1</sup>
3,55	1,2	2,1	3,7	6,4	1,3
3,9	2,3	3,0	3,95	12,7	2,2
4,2	3,0	4,0	4,2	15,6	2,8
4,35	5,1	5,5	4,4	14,0	3,0
4,85	4,5	4,8	5,0	14,7	3,0
5,5	4,5	4,4	5,55	12,0	3,7
5,9	7,0	4,6	6,0	12,7	3,7
6,4	13,1	4,8	6,15	12,0	3,3
6,8	15,3	3,2	6,4	12,0	2,8
7,3	14,1	1,5	6,7	15,7	3,7
			6,95	43,5	4,0
			7,3	47,5	3,7

\* Средняя квадратичная ошибка (в процентах к значениям величин) составляет от 8 до 16%.

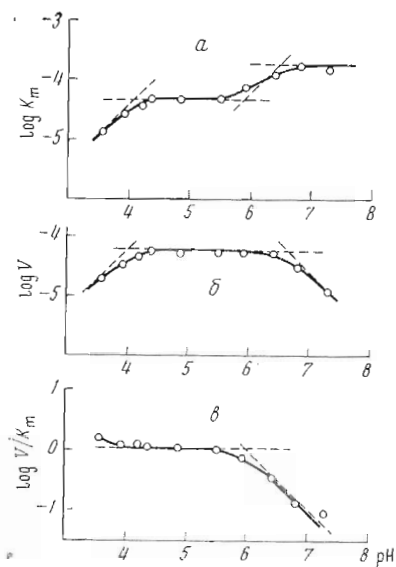


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость параметров Михаэлиса от рН для ламинариназы IV (метод Нельсона)

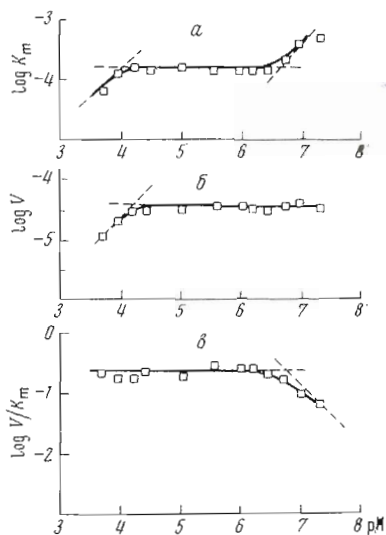


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость параметров Михаэлиса от рН для ламинариназы IV (глюкозооксидазный метод)

акте (рис. 4, б). Одно из возможных объяснений этого — различный механизм действия фермента на субстрат и короткие его аналоги [8], образующиеся в процессе ферментативного гидролиза. Возможно также, что этот факт отражает иной механизм действия при осуществлении изучаемой эндоглюканазой множественной атаки на субстрат.

Из представленных данных видно, что каталитическая активность  $\beta$ -1,3-глюканазы IV из *S. sachalinensis* контролируется двумя группами с  $pK_a$  6,8 и 4,0. Первая из них может быть имидазольной группой гистидина или аминогруппой, вторая — карбоксильной группой глутаминовой или аспарагиновой кислоты.

Из результатов аналогичных исследований были сделаны предположения для нескольких  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилаз [9, 10] и целлюлазы [11] о присутствии имидазольной и карбоксильной групп в активном центре.

### Экспериментальная часть

Ламинарин из морской водоросли *Laminaria sycharioides* (степень полимеризации 30;  $\beta$ -1,3 :  $\beta$ -1,6 = 30 : 1) был получен по методике [3]; лишенин [4] (степень полимеризации 52—410;  $\beta$ -1,3 :  $\beta$ -1,4 = 1 : 3) — коммерческий препарат фирмы «Koch Light Laboratories» (Англия).

$\beta$ -1,3-Глюканаза (ламинариназа IV) была получена по методике [2]. Активность ее определяли по возрастанию количества восстанавливающих сахаров методом Нельсона [5] и возрастанию количества глюкозы глюкозооксидазным методом [6] (использовали набор ТСМ-1 фирмы «Boehringer», ФРГ).

рН-Оптimum определяли в интервале рН 3,5—8,5 в ацетатно-фосфатно-боратном буфере (0,1 М по каждой компоненте) для субстратов лишенина (300 мкг/мл) и ламинарина (400 мкг/мл). Температура инкубации 37°, время инкубации — 10 мин.

Для определения рН-устойчивости алиquotы фермента (0,05 мл) инкубировали в указанном выше буферном растворе (0,05 мл) при различных рН (3,5—8,5) в течение 1 ч при 37°, затем добавляли раствор ламинарина

(0,4 мл, 400 мкг/мл) в 0,2 М ацетатном буфере (рН 5,6) и смесь инкубировали 10 мин при 37°. Активность фермента определяли методом Нельсона.

Определение влияния рН на константы  $K_m$  и  $V$  проводили при 37° в ацетатно-фосфатном буфере (0,15 М по каждой компоненте) для концентраций ламинарина 170, 250, 330, 415, 450 мкг/мл — в интервале рН 3,3—6,0 и для концентраций ламинарина 330, 500, 670, 830 и 1000 мкг/мл — в интервале рН 6,0—7,6. Время реакции не превышало 20 мин.

Расчет проводили по методу двойных обратных величин Лайнуивера — Берка [12].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Диксон М., Уэбб Э. (1966) Ферменты, гл. 4, «Мир» М.
2. Sova V. V., Elyakova L. A. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 258, 219—227.
3. Elyakova L. A., Zvyagintseva T. N. (1974) *Carbohydrate Res.*, 34, 241—243.
4. Barras D. R., Moore A. E., Stone B. A. (1969) in *Cellulases and their Application*, *Advances Chem. Ser* 95, Washington Amer. Chem. Soc., pp. 105—138.
5. Nelson N. (1944) *J. Biol. Chem.*, 153, 375—381.
6. Keston A. (1956) *Abstr. Paper* 129, Meeting Amer. Chem. Soc. S31c.
7. Hiromi K., Takahashi K., Hamaizu Z., Ono S. (1966) *J. Biochem.*, 59, 469—475.
8. Ohnishi M., Suganuma T., Hiromi K. (1974) *J. Biochem.*, 75, 767—777; 76, 7—13.
9. Белевский Д. М., (1970). Успехи биол. химии, т. 12, стр. 164—181, «Наука», М.
10. Greenwood S. T., Milne E. A. (1968) *Advances Carbohydr. Chem. and Biochem.*, 23, 282—366.
11. Petersson G. (1969) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 130, 286—294.
12. Lineweaver H., Burk D. (1934) *J. Amer. Chem. Soc.*, 56, 658—665.

Поступила в редакцию  
26.11.1975

#### EFFECT OF pH ON THE KINETIC PARAMETERS OF $\beta$ -1,3-GLUCANASE FROM *SPISULA SACHALINENSIS*

ELYAKOVA L. A., ZVYAGINTSEVA T. N.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East  
Science Centre, Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

The study of pH effect on the enzymic activity of endo- $\beta$ -1,3-glucanase from the marine mollusc *S. sachalinensis* allowed to determine the ionization constants of some active centre groups. It was shown that the catalytic activity is controlled by the two groups with  $pK_a$  6.8 and 4.2. The first might be the imidazole group of histidine or the amino group, and the second—the carboxyl group of aspartic or glutamic acids.