



УДК 557.158.1

© 1990 г.

Г. И. Квеситадзе, Р. С. Сванидзе, В. Л. Цурпун*,
Д. Н. Нишарадзе, Л. Т. Чиргадзе, Т. Ш. Буачидзе

ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА И СВОЙСТВА β -ГЛЮКОЗИДАЗЫ,
ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ТЕРМОФИЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ
ASPERGILLUS WENTII

Институт биохимии растений АН ГССР, Тбилиси;

* Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова АН СССР, Москва

Исследована внеклеточная β -глюкозидаза термофильного микромицета *Aspergillus wentii*. Разработан метод очистки фермента до гомогенного состояния, установлены оптимальные условия гидролиза целлобиозы и кинетические параметры этого процесса. Методом электронный микроскопии показано, что молекулы фермента являются гексамерами с мол. массой 230 000. Проведено исследование термостабильности фермента, оценены термодинамические параметры и предложен механизм термоинактивации.

Известно, что β -глюкозидазы не только гидролизуют молекулы целлобиозы до глюкозы [1], но и осуществляют метаболический контроль индукции целлюлазного комплекса [2]. Молекулярные массы ныне известных β -глюкозидаз варьируют в очень широких пределах — от 35 000 до 305 000 [3, 4]. В настоящее время можно считать установленным существование трех типов β -глюкозидаз [5]:

- 1) целлобиазы, расщепляющие целлобиозу и не действующие на арил- β -глюкозиды;
- 2) β -глюкозидгидролазы, обладающие широкой специфичностью по отношению к агликону;
- 3) арил- β -глюкозидазы, расщепляющие β -глюкозиды, аглюконами которых являются производные арилового спирта.

Цель настоящей работы — установление пространственной структуры β -глюкозидазы *Aspergillus wentii* и исследование механизма и параметров процесса термоинактивации этого фермента. Выбор микромицета обусловлен тем, что входящая в состав его целлюлазного комплекса β -глюкозидаза обладает высокой термостабильностью и уникальной для внеклеточных ферментов термофилов четвертичной структурой, которая будет представлена и обсуждена в данной работе.

Культуру *A. wentii* выращивали глубинным способом на модифицированной питательной среде Чапека — Докса в условиях, обеспечивающих максимальный уровень целлобиазной активности в культуральной жидкости. Ферментный препарат выделяли, осаждая белок из культуральной жидкости этанолом. Удельная целлобиазная активность полученного препарата составляла 0,92 МЕ/мг.

В результате очистки препарата (табл. 1) была получена электрофоретически гомогенная β -глюкозидаза с удельной активностью 43 МЕ/мг. По данным гель-фильтрации на сефадексе G-200 и электрофореза в градиенте пористости полиакриламидного геля, молекулярная масса β -глюкозидазы *A. wentii* составляет 230 000.

Для электронно-микроскопических исследований образцы препаратов негативно контрастировали раствором фосфорновольфрамовой кислоты. Зашумленные изображения двумерных кристаллов отфильтровывали от фона на оптическом дифрактометре конструкции Института кристалло-

Очистка β -глюкозидазы *A. wentii*

Стадии очистки	Белок, мг	Общая активность, ед.	Удельная активность, ед./мг	Степень очистки	Выход по белку, %	Выход по активности, %
Исходный раствор пре-парата	800	740	0,92	1	100	100
Ультрафильтрация DEAE-Тоуорpearl 650	556	676	1,21	1,3	69,5	91,3
CM-Тоуорpearl 650	105	438	4,16	4,5	13,2	59,3
Ультрогель AcA-34	27,5	277	10,1	11,0	3,4	37,5
	1,6	68,8	43,0	46,7	0,2	9,3

графии АН СССР. Изображения одиночных частиц β -глюкозидазы показаны на рис. 1а. Наблюдается ряд характерных типов изображений, которые можно трактовать как проекции одной и той же молекулы: 1) в форме шестиконечной «звезды» или правильного шестиугольника диаметром около 9 нм (рис. 1б). Этот тип преобладает и соответствует, по всей вероятности, наиболее устойчивому положению молекулы на подложке; 2) в форме параллелограмма длиной 8,5—9 нм и шириной около 6 нм (рис. 1а); 3) прямоугольной формы размером около 7,5 × 6 нм (рис. 1а); 4) квадратных очертаний с четырьмя доменами по вершинам и со стороны около 7 нм (рис. 1д); 5) крестообразные изображения (рис. 1е). Сравнивая их, можно предположить, что первый тип является фронтальной проекцией молекулы, а второй и третий — боковыми. Анализ всех указанных проекций позволил нам предположить упрощенную модель молекулы: шесть субъединиц расположены в двух слоях по вершинам треугольной антипризмы с точечной группой симметрии 32 (D_3). Проекция модели, соответствующие различной ориентации частиц, приведены в правой части рис. 1. Первый тип изображений (рис. 1б) соответствует фронтальной проекции молекулы (вдоль оси вращения третьего порядка). Когда модель просматривается перпендикулярно оси третьего порядка (боковые проекции) вдоль двух осей второго порядка, пересекающихся под углом 30°, она находит второй (рис. 1а) и третий (рис. 1а) типы изображений. В этих проекциях хорошо видны два белковых слоя молекулы, разделенные контрастером. На основе предложенной модели нетрудно объяснить квадратные и крестообразные (рис. 1д, е) изображения. Объем мономеров в предполагаемой модели составляет около 50 нм³, что соответствует молекулярной массе 35 000—40 000; это хорошо согласуется с вышеприведенными данными для гексамера (230 000). Наблюдаются также треугольные изображения, имеющие форму и размер, соответствующие половине молекулы (рис. 1ж). Это означает, что молекула, вероятно, может диссоциировать на два тримера.

Небольшие двумерные кристаллические агрегаты молекул (рис. 1з) характеризовались решеткой с почти правильной гексагональной симметрией и постоянной решетки 8,5—9 нм. Наилучшие из негативно контрастированных кристаллов, которые показали дифракционную картину до разрешения около 2,5 нм, были профильтрованы оптическим методом. Это позволило получить очищенные от фона изображения, в которых лучше выявляются основные детали изображения. На профильтрованных изображениях двумерных кристаллов β -глюкозидазы отчетливо видна гексагональная проекция частиц с шестью пиками белковой плотности (рис. 1з). Эта проекция имеет форму и размер, подобные изображению одиночных частиц первого типа (рис. 1б), что указывает на гексамерное строение фермента.

Таким образом, электронно-микроскопические снимки показывают, что β -глюкозидаза *A. wentii* — гексамер.

В дальнейшем в работе будут приведены данные, полученные для очищенной до гомогенного состояния β -глюкозидазы *A. wentii*.

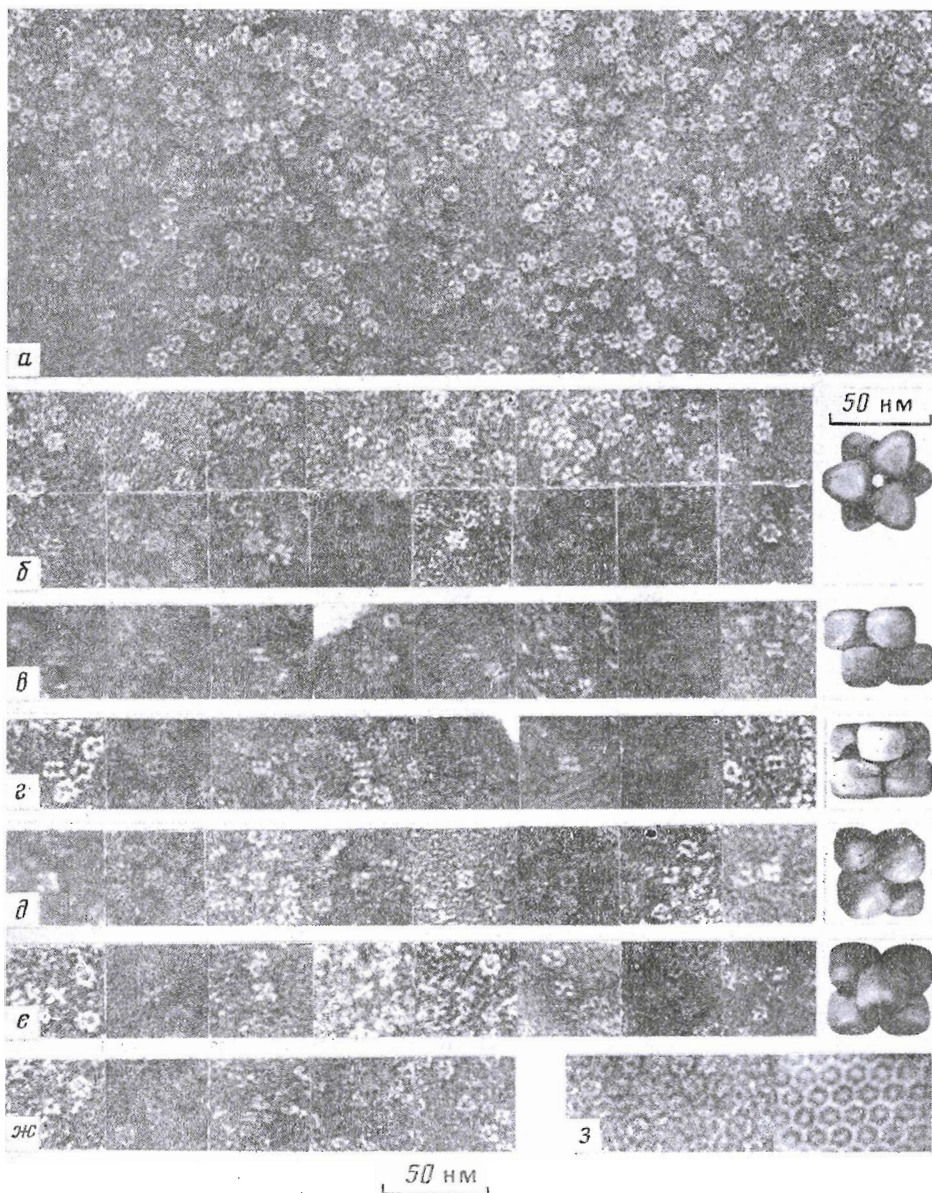


Рис. 1. Электронно-микроскопические снимки и модель β -глюкозидазы *A. wentii*

При исследовании процесса термоинактивации контрольную реакцию проводили при 40°C , так как при этой температуре β -глюкозидаза за время реакции полностью сохраняет свою каталитическую активность. В этих условиях удельная активность фермента составляет 32 ед. акт./мг, константа Михаэлиса равна 3,2 мМ, а максимальная скорость катализируемой реакции гидролиза целлобиозы — 0,32 ед. акт.·мл⁻¹. Молекулярная активность при этом равна 7400 мин⁻¹. Выбранная рабочая концентрация фермента (0,01 мг·мл⁻¹, $4,3 \cdot 10^{-5}$ мМ) находится в пределах диапазона концентраций, внутри которого целлобиазная активность прямо пропорциональна концентрации фермента $[E]_0$, что гарантирует получение достоверных результатов при его термоинактивации.

Как видно из рис. 2, процесс термоинактивации глюкозидазы *A. wentii* состоит из некоторого количества элементарных стадий, две из которых (начальную и конечную) можно оценить количественно. Действительно, в растворе β -глюкозидазы *A. wentii* одновременно находится два типа моле-

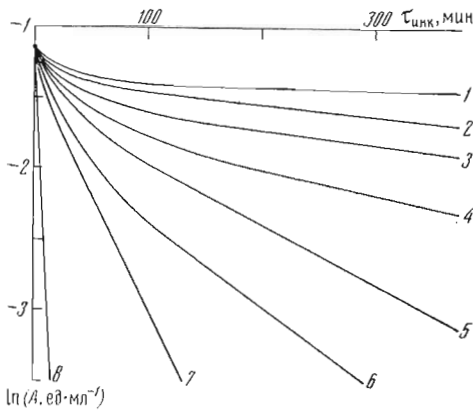


Рис. 2

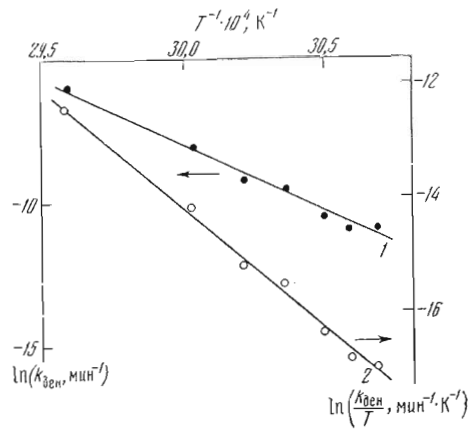


Рис. 3

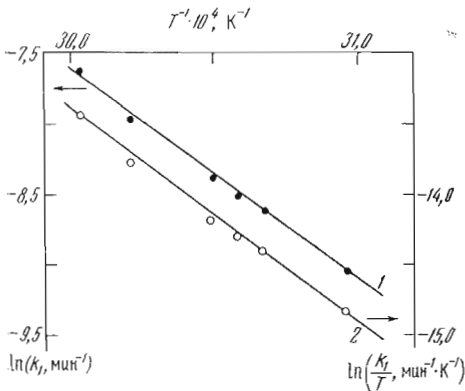


Рис. 4

Рис. 2. Кинетические кривые термоинактивации β -глюкозидазы *A. wentii* при следующих температурах инкубации: 1 — 50; 2 — 53; 3 — 54; 4 — 55; 5 — 56,5; 6 — 58; 7 — 60; 8 — 65° С

Рис. 3. Зависимость констант скорости денатурации субъединиц β -глюкозидазы от температуры

Рис. 4. Зависимость эффективной константы k_1 от температуры инкубации

кул — гексамеры E_6 и тримеры E_3 (рис. 1ж). Это обычная картина при наличии в системе диссоциативно-ассоциативного равновесия, в данном случае равновесия типа $E_6 \rightleftharpoons 2E_3$. В процессе термоинактивации неизбежно происходит диссоциация тримеров (а возможно, и гексамеров) на субъединицы и, наконец, необратимая денатурация последних, характеризующаяся определенным значением константы скорости денатурации $k_{ден}$. Очевидно, что эту константу можно оценить величиной угла наклона асимптоты к кинетической кривой термоинактивации в координатах $\ln A \div t$ при $t \rightarrow \infty$. Зависимость $k_{ден}$ от температуры позволяет оценить термодинамические параметры данного процесса (табл. 2, рис. 3).

Расчетам по данным рис. 8 показано, что энергия активации перехода отдельной субъединицы β -глюкозидазы из нативного в денатурированное состояние (E_n) составляет 95,3 ккал·моль⁻¹, в то время как изменение энтальпии $\Delta H^\ddagger = 85,3$ ккал·моль⁻¹. Оценка других параметров не представляется корректной, так как описываемый процесс не наблюдается уже при 50° С.

Для количественной оценки начального этапа процесса термоинактивации можно ввести эффективную константу k_1 , характеризующую скорость данного процесса при $t \rightarrow 0$. Эта величина также зависит от температуры (табл. 2). Термодинамические величины, характеризующие указанную стадию термоинактивации, можно получить из зависимостей, представленных на рис. 4. Согласно этим зависимостям, $E_a = 29,1$ ккал·моль⁻¹, а $\Delta H^\ddagger = 29,8$ ккал·моль⁻¹. В то же время ввиду того, что данный процесс требует незначительных затрат энергии, можно оценить ΔF^\ddagger и ΔS^\ddagger . Действительно, прямая 1 на рис. 4 описывается уравнением $k_1 = 36,38 - 1,47 \cdot 10^4 \cdot T^{-1}$, откуда легко найти $k_{1ст}$ при $T = 298$ К; полученное значение позволяет вычислить интересующие нас параметры. Оказалось, что

Зависимость параметров денатурации β -глюкозидазы от температуры.
Условия определения: 0,05 М ацетатный буфер, pH 4,3

$t_{инк}, ^\circ\text{C}$	50	53	54	55	56,5	58	60	65
$k_{ден} \cdot 10^4, \text{мин}^{-1}$	0	8,7	10,0	15,7	40,6	53,8	157	1500
$k_1 \cdot 10^3, \text{мин}^{-1}$	7,0	10,8	11,9	13,5	17,2	20,5	29,1	150

Таблица 3

Характеристические времена τ_1 и τ_2 процесса термоинактивации
 β -глюкозидазы *A. wentii*

$t_{инк}, ^\circ\text{C}$	50	53	54	55	58	60
$\lg \tau_1$	—	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
$\tau_1, \text{мин}$	—	5	5	5	5	5
$\lg \tau_2$	8	6,0	4,5	3,5	2,6	2,3
$\tau_2, \text{мин}$	8	10^6	$3,2 \cdot 10^4$	$3,2 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^2$

$\Delta F^\circ = 25,0$ ккал·моль⁻¹, а изменение стандартной энтропии $\Delta S^\circ = 15,6$ э. е./моль.

В то же время суммарный тепловой эффект, полученный при калориметрическом исследовании данного процесса, составил 400 ккал·моль⁻¹, при этом наблюдается скачок удельной теплоемкости системы при переходе ее из нативного в денатурированное состояние. Этот скачок составляет $4,0 \cdot 10^{-2}$ кал·г⁻¹·К⁻¹. Следовательно, система, как и ожидалось, переходит в разупорядоченное состояние, характеризующееся большим значением энтропии.

Необходимо обратить внимание на то обстоятельство, что при больших значениях времени (τ) в системе практически будут происходить только необратимые изменения, имеющие экспоненциальный характер, поэтому конечные участки кинетических кривых в координатах $A/A_0 \div \lg \tau$ [6] должны спрямляться и при их экстраполивании в сторону как меньших, так и больших значений времени должны давать на пересечении с прямой $A/A_0 = 1$ и осью абсцисс логарифмы момента начала этих необратимых изменений (τ_1) и их завершения (τ_2), т. е. полной инактивации фермента. На рис. 5 представлены соответствующие зависимости для вышеприведенных (рис. 2) кинетических кривых. Данные, полученные на основании этого рисунка, суммированы в табл. 3.

Необратимые изменения в молекулах возникают практически в момент начала термоинактивации (табл. 3), однако их невозможно выявить на фоне обратимых стадий. К тому же энергия активации этих процессов существенно выше, чем обратимых, и требуется гораздо больше времени для их завершения, ведущего к полной потере ферментативной активности. Для наглядности на рис. 6 схематически представлен процесс инактивации β -глюкозидазы при различных температурах с исключением из рассмотрения обратимых стадий.

Была исследована также зависимость кинетических параметров от начальной концентрации фермента при 55° С, для которой наиболее наглядно проявляется стадийность процесса термоинактивации.

Эффективная константа k_1 слабо зависит от исходной концентрации фермента (рис. 7), и для исследованных концентраций ($E_0 \cdot 10^3$ мг/мл), равных 0,5; 1,0; 1,5; 2,0, ее значение несколько убывает, но убыль эта столь мала, что с хорошей степенью достоверности можно считать кинетически малосущественным наличие обратимости уже на начальной стадии термоинактивации. Это позволяет путем экстраполяции асимптоты ко второй

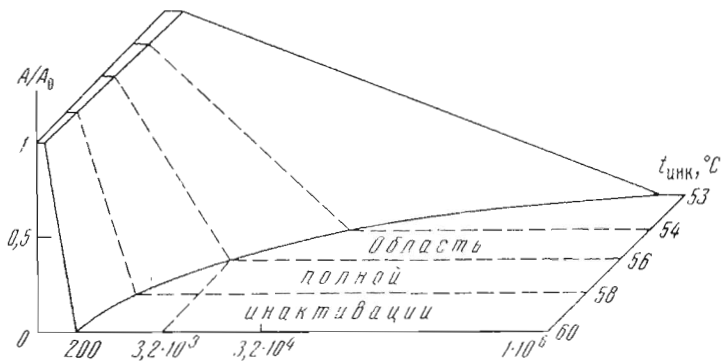


Рис. 5

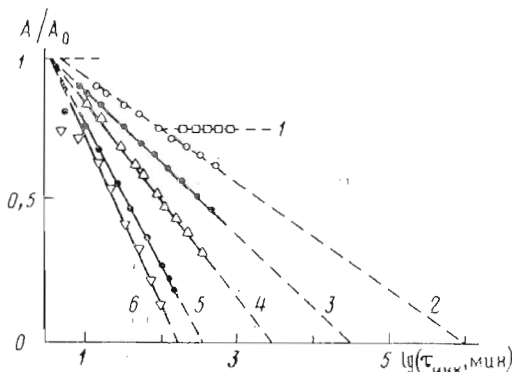


Рис. 6

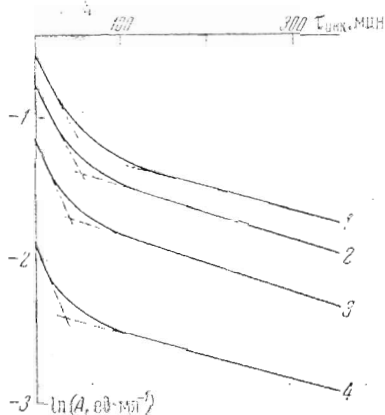


Рис. 7

Рис. 5. Кинетические кривые термоинактивации β -глюкозидазы, характеризующие необратимые изменения фермента

Рис. 6. Кинетические кривые термоинактивации β -глюкозидазы *A. wentii* в координатах уравнения $A/A_0 = a - b \ln t$. Температура инкубации: 1 — 50; 2 — 53; 3 — 54; 4 — 55; 5 — 58; 6 — 60°C

Рис. 7. Влияние концентрации фермента на процесс термоинактивации β -глюкозидазы *A. wentii* при 55°C. $[E]_0 \cdot 10^2 = 2$ (1), 1,5 (2), 1,0 (3) и 0,5 мг/мл (4)

стадии данного процесса оценить величину активности отдельной субъединицы β -глюкозидазы. Действительно, как видно из рис. 7, если бы весь белок в ферментном растворе изначально присутствовал в виде мономеров, то при тех же его весовых количествах активности растворов составляли около 60% от действительной активности, когда в растворе преобладают формы E_6 . Следовательно, молярная активность отдельной субъединицы составляет $\sim 10\%$ молярной активности молекул E_6 . Необходимо отметить, что распад молекул E_6 до субъединиц в процессе термоинактивации подтвержден данными по необратимому возрастанию в течение процесса доли молекул с массой около 40 000.

Экспериментальная часть

Термофильный микромидет *A. wentii* выращивали на модифицированной среде Чапека — Докса путем глубинного культивирования. Состав среды (%): микрокристаллическая целлюлоза ЛГ — 1,0, NaNO_3 — 0,3, KH_2PO_4 — 0,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,05, кукурузный экстракт — 1,5. В качестве посевного материала использовали суспензию конидий 10-суточных культур, выращенных на 8% сусло-агаре. 36-часовые культуры засеивали в 30-литровые ферментеры «Marubishi» (Япония) с вышеуказанной средой и выращивали 4 сут при 40°C. Эти условия обеспечивали максимальный уровень целлюlobиазной активности в культуральной среде. Фер-

ментный препарат выделяли осаждением из 1,5 л культуральной жидкости четырьмя объемами этанола, охлажденного до -15°C . Осадок лиофилизировали.

На первой стадии очистки 5% раствор препарата подвергали ультрафильтрации с использованием мембраны XM-50 (Amicon, США). 50 мл полученного раствора (концентрация 5,5 мг/мл) наносили на колонку ($2,6 \times 7,5$ см) со смолой DEAE-Toyorearl 650M, уравновешенной 0,05 M ацетатным буфером, pH 4,5. Элюцию проводили градиентом концентрации NaCl (0,05 — 0,20 M). На второй стадии раствор хроматографировали на колонке ($2,6 \times 3,0$ см) со смолой CM-Toyorearl 650 M, уравновешенной 0,05 M ацетатным буфером, pH 3,9. Белки элюировали с помощью градиента pH (3,9—5,9). Полученный раствор (5 мл, 5,5 мг белка/мл) хроматографировали на ультрогеле AcA-34 (колонка $1,6 \times 87$ см) в 0,05 M ацетатном буфере, содержащем 0,17 M NaCl, pH 4,5. Собирали фракции объемом по 3 мл.

При определении молекулярной массы методом гель-фильтрации использовали колонку ($1,2 \times 81$ см) с сефадексом G-200, уравновешенным 0,02 M уксуснокислым аммонием. Колонку калибровали препаратами белков с известными молекулярными массами; наносили 4—6 мг образца, растворенного в 0,5—1,0 мл 0,02 M уксуснокислого аммония. Собирали фракции по 2 мл при скорости потока 5—8 мл/ч.

Электрофорез в градиенте пористости полиакриламидного геля $4 \rightarrow 30\%$ при pH 8,3 проводили в приборе фирмы Pharmacia (Швеция). Напряжение 220 В, сила тока около 20 мА, время опыта 3,5 ч. Метчиком служил бромфеноловый синий. Окраску проводили с помощью кумасси ярко-голубого Р-250.

Определение активности β -глюкозидазы. Использовали D-целлобиозу (Serva, ФРГ), пероксидазу (Reanal, Венгрия) с активностью 30—40 тыс. ME/г, глюкозооксидазу с активностью 90—134 тыс. ME/г, ферроцианид калия, х. ч.

Глюкозооксидазно-пероксидазный реактив готовили из 50 мг глюкозооксидазы и 30 мг пероксидазы растворением в 330 мл 0,4 M фосфатного буфера (pH 7,5) с последующим разбавлением до 500 мл 0,1% раствором ферроцианида калия [7].

Целлобиазную активность (A) определяли путем измерения концентрации глюкозы, образовавшейся в результате гидролиза целлобиозы. К 1,8 мл 27 mM раствора целлобиозы в 0,05 M ацетатном буфере, pH 4,3, добавляли 0,2 мл раствора исследуемой целлобиазы (конечная концентрация $4,3 \cdot 10^{-5}$ mM), инкубировали при 40°C и определяли количество образовавшейся глюкозы [7]: 0,2 мл реакционной смеси выдерживали 60 мин с 3 мл глюкозооксидазно-пероксидазного реактива при комнатной температуре, измеряли поглощение при длине волны 410 нм.

Целлобиазную активность оценивали по начальной скорости катализируемой реакции гидролиза целлобиозы:

$$A = v_0 = 0,5 \cdot [G] \cdot M^{-1} \cdot \tau^{-1},$$

где $[G]$ — концентрация образовавшейся глюкозы ($\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$), M — молекулярная масса глюкозы, τ — время гидролиза (мин), обычно оно не превышало 5 мин.

За единицу целлобиазной активности принята скорость такой реакции, при которой в 1 мин гидролизуется 1 мкмоль целлобиозы (в данном случае в 1 мл реакционной смеси).

Микрофотографии получены на электронном микроскопе Philips EM400 при увеличении 50 000 и ускоряющем напряжении 80 кВ. 50 мкл раствора β -глюкозидазы в 0,05 M ацетатном буфере, pH 7,0 (1 мг/мл), наносили на углеродную пленку-подложку и удаляли избыток жидкости. Препараты негативно контрастировали 2% раствором фосфорновольфрамсвой кислоты.

Процесс плавления β -глюкозидазы *A. wentii* изучали с помощью сканирующего дифференциального микрокалориметра с чувствительностью 10^{-7} Вт [8].

1. Клесов А. А., Рабинович М. Л., Сеницын А. П., Чурилова И. В., Григораш С. Н. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. С. 1225—1242.
2. Shewale J. G. // Int. J. Biochem. 1982. V. 14. № 6. P. 435—443.
3. Enari T. M., Niku-Raavola M. L., Marju L., Lappalainen A., Nummi M. // J. Appl. Biochem. 1981. V. 3. № 2. P. 157—163.
4. Loureiro Dias M. C. // Cienc. Biol. 1981. V. 6. P. 279—286.
5. Клесов А. А. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 9. С. 1377—1395.
6. Чухрай Е. С. // Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. 1981. Т. 22. № 3. С. 261—265.
7. Щербухин В. Д., Миронов Л. И., Кондырева А. В., Грюнер В. С. // Прикл. биохимия и микробиология. 1970. Т. 6. № 4. С. 467—470.
8. Монаселидзе Д. Р., Баградзе Н. Г. // Конформационные изменения биополимеров в растворах. М.: Наука, 1973. С. 196—198.

Поступила в редакцию
13.X.1988

После доработки
12.1.1990

G. I. KVESITADZE, R. S. SVANIDZE, V. L. TEUPRUN*, D. N. NIZHARADZE,
L. T. CHIRGADZE, T. Sh. BUACHIDZE

**QUARTERNARY STRUCTURE AND PROPERTIES OF β -GLUCOSIDASE
ISOLATED FROM A THERMOPHILIC CULTURE OF *ASPERGILLUS WENTII***

Institute of Plant Biochemistry, Academy of Sciences of the GSSR, Tbilisi

* *A. V. Shubnikov Institute of Crystallography, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

A method of purification of an extracellular β -glucosidase from thermophilic micro-mycete *Aspergillus wentii* to the homogeneous state has been developed. The molecular mass of the enzyme, optimal conditions and kinetic parameters of cellobiose hydrolysis have been determined. The enzyme thermostability has been studied, thermodynamic parameters estimated and the mechanism of thermoinactivation suggested.