БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 3 * №12 * 1977

УДК 577.154

ЭКЗО-β-1,3-ГЛЮКАНАЗА ИЗ УЛИТКИ *EULOTA MAAKII*

Елякова Л. А., Широкова Н. И.

Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного научного центра Академии наук СССР, Владивосток

β-1,3-Глюканглюканогидролаза (КФ 3.2.1.6), гомогенная по данным электрофореза в полиакриламидном геле, выделена из пищеварительного тракта улитки *Eulota maakii* ионообменной хроматографией на СМ-целлюлозе с последующей гель-фильтрацией на биогеле Р-150. pH-Оптимум фермента равен 5,2; температурный оптимум 55°. Фермент стабилен в области pH 4—7 и устойчив в течение 30 мин при 50°. Показано, что выделенная β-1,3-глюканаза принадлежит к ферментам экзо-типа действия.

β-1,3-Глюканазы широко распространены в природе: они найдены в бактериях, водорослях, высших растениях, грибах. В последние годы описано несколько новых эндо-глюканаз (из *Bacillus circulanus* [1], *Schizosaccharomyces* [2], ржи [3], ячменного солода [4]) и экзо-глюканаз (из микроорганизмов [5, 6]). Известно лишь несколько глюканаз из беспозвоночных — морского ежа [7], моллюска *S. sachalinensis* [8], улитки *Helix pomatia* [9]. В связи с этим выделение и изучение β-1,3-глюканазы из улитки *E. maskii*, чему посвящена настоящая работа, представляет определенный интерес.

Ранее нами было показано [10], что пищеварительный тракт улитки *E. maakii* наряду с большим набором высокомолекулярных гликозидаз содержит β-1,3-глюканазную активность. В качестве продукта ферментолиза ламинарина β-1,3-глюканазами была отмечена только глюкоза, что позволило предположить экзо-тип действия ферментов.

Для выделения гомогенной экзо-β-1,3-глюканазы нами разработана следующая схема. В качестве первой стадии очистки была выбрана ионообменная хроматография суммарного ферментного препарата на СМ-целлюлозе (СМ-32) в линейном градиенте концентраций NaCl от 0 до 0,2 М. При этом происходит разделение β-1,3-глюканазной активности, которая обнаруживается в пиках I—IV, обозначенных в порядке выхода их с колонки (рис. 1). Активные фракции 120—130 пика II, содержащие минимальное количество сопутствующих глюкозидазных активностей, были подвергнуты дальнейшей очистке. При гель-фильтрации его на биогеле Р-150 происходит отделение высокомолекулярных глюкозидаз (рис. 2). Полученная таким образом ламинариназа II оказалась электрофоретически гомогенной. Диск-электрофорез фермента при двух величинах pH (4,3 и 8,3) показал наличие одной белковой полосы, совпадающей с одной полосой активности при проявлении столбика геля после электрофореза при pH 4,3. При 8,3 не удалось обнаружить ламинариназную активность — по-видимому, в этих условиях фермент инактивировался.

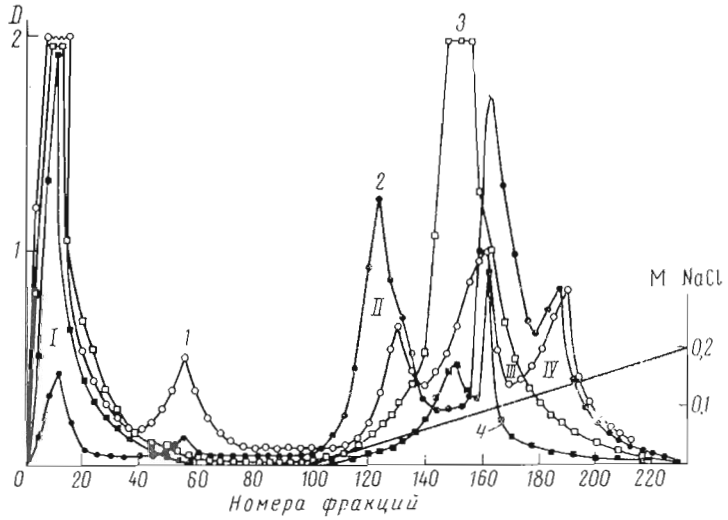

Рис. 1. Хроматография суммарного ферментного препарата на СМ-целлюлозе (см. «Экспер. часть»). *1* — оптическая плотность раствора белка при 280 нм; *2* — β-1,3-глюканазная активность; *3* — β-глюкозидазная активность; *4* — α-глюкозидазная активность

Результаты очистки (табл. 1) показывают, что полученная ламинариназа II имеет невысокую степень очистки (в 3 раза). Следует, однако, отметить, что подсчет возрастания активности был приблизительным, так как начальная активность препарата включала активность всех β-1,3-глюканаз смеси, удаление большинства которых происходило на первой стадии очистки.

Были изучены некоторые свойства выделенной ламинариназы II. Оказалось, что pH-оптимум ее равен 5,2 (рис. 3*а*), что несколько выше pH-оптимума экзо-β-1,3-глюканазы из *H. pomatia* [9]. Фермент стабилен в течение 3 ч при 37° в области pH 4—7 (рис. 3*б*). Температурный оптимум близок температурному оптимуму экзо-β-1,3-глюканазы из *H. pomatia* (соответственно 55 и 53°) (рис. 4*а*). β-1,3-Глюканаза устойчива в течение 30 мин при температурах до 50° и быстро инактивируется при более высоких температурах (рис. 4*б*).

Из данных тонкослойной гель-фильтрации на сефадексе G-200 был определен молекулярный вес фермента: ~100 000.

Дальнейшее изучение требовало строгого доказательства типа действия очищенной β-1,3-глюканазы II. Возможны два типа действия карбогидраз на полисахариды: экзо-гликаназы последовательно отщепляют моно- или дисахариды от невосстанавливающего конца полимера, а эндоферменты расщепляют гликозидные связи внутри полисахаридной цепи.

Таблица 1

Очистка экзо-ламинариназы из *E. maakii*

Стадии очистки	Белок, мг	Суммарная β-1,3-глюканазная активность	Специфическая активность, ед/мг	Выход, %	Степень очистки
Сырой препарат	900	2000	2,2	100	1
Хроматография на СМ-целлюлозе (пик II)	63	200	3,1	10	1,4
Гель-фильтрация на биогеле Р-150 (пик II)	3,4	24,3	7,1	1,2	3,2

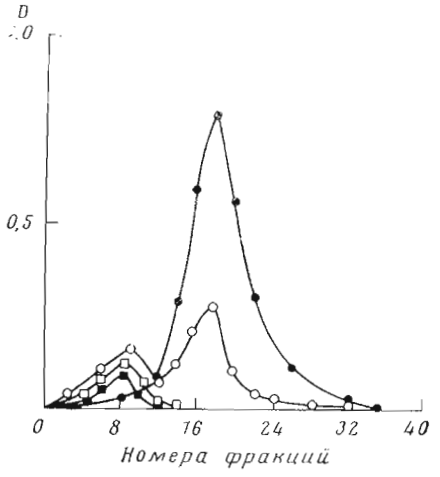

Рис. 2. Гель-фильтрация активных фракций 120—130 (пик II), полученных разделением на СМ-целлюлозе, на биогеле Р-150 (см. «Экспер. часть»). Обозначения кривых как на рис. 1

Было показано, что увеличение восстанавливающей способности инкубационной смеси при ферментативном гидролизе экзо-β-1,3-глюканазами происходит в основном за счет накопления глюкозы [11]. В нашем случае использование двух независимых методов количественного анализа продуктов ферментативного гидролиза — определения восстанавливающей способности по методу Нельсона [12] и определения глюкозы глюкозооксидазным методом [13] — позволило сделать вывод об экзо-типе действия ламинариназы II. Действительно, на начальной стадии реакции число микромолей образующейся глюкозы практически совпадает с количеством восстанавливающих сахаров, определенных по методу Нельсона (рис. 5).

Известно, что экзо-гликаназы гидролизуют молекулы субстрата, начиная с невосстанавливающего конца. Поэтому модифицированные субстраты с измененным невосстанавливающим моносахаридным остатком не подвергаются действию экзо-ферментов [14], тогда как такая модификация субстратов практически не сказывается на скорости их гидролиза эндо-ферментами [8]. В нашем случае субстратами, в которых были изменены как восстанавливающие, так и невосстанавливающие глюкозные остатки, были периодатно-окисленный и периодатно-окисленный, а затем

Таблица 2

Действие ламинариназы II на модифицированные субстраты и лихенин

Субстрат	Ламинарин из *L. cycharioides*	Периодатно-окисленный ламинарин	Периодатно-окисленный и затем восстановленный ламинарин	Ламинарин из *L. hyperborea*	Лихенин
Относительная степень гидролиза в стандартных условиях	100	0	0	96	1

Таблица 3

Данные измерения оптического вращения в процессе ферментолиза β-1,3-глюканазой II
Ламинарин из ***L. cycharioides***

Время ферментолиза, мин	α, град	$[\alpha]_D$, град	Время ферментолиза, мин	α, град	$[\alpha]_D$, град
0	−0,012	−12,0	20	+0,029	+29,0
5	+0,003	+3,0	30	+0,045	+45,0
10	+0,010	+10,0	40	+0,050	+50,0
15	−0,019	+19,0	После добавления NH_4OH	+0,028	+28,0

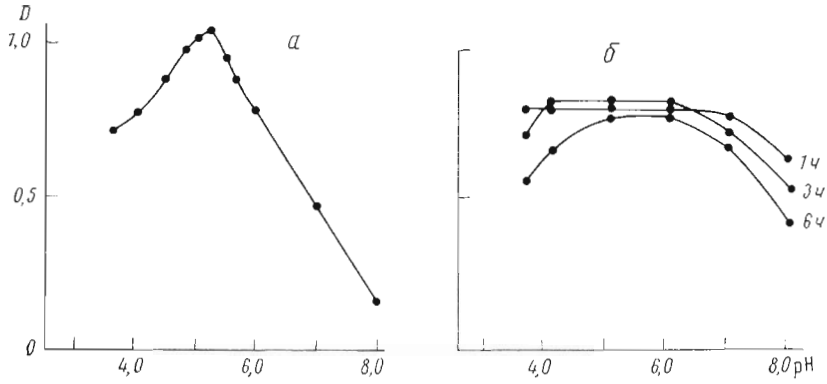

Рис. 3. Зависимость активности (*а*) и стабильности (*б*) ламинариназы II от pH

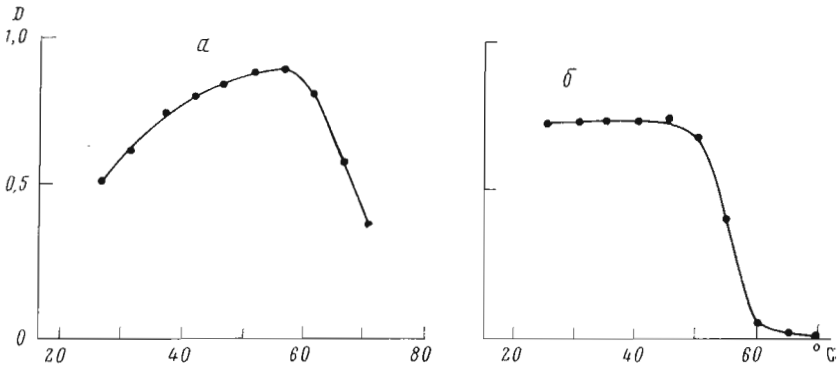

Рис. 4. Зависимость активности (*а*) и стабильности (*б*) ламинариназы II от температуры

восстановленный боргидридом натрия ламинарины. Как видно из табл. 2, при действии ламинариназы II модифицированные субстраты не гидролизовались.

Было также исследовано действие фермента на лихенин — смешанный β-1,3- и β-1,4-глюкан. По имеющимся данным, экзо-β-1,3-глюканазы в отличие от эндо-1,3-глюканаз не разрушают смешанные глюканы [15, 16]. Оказалось, что ламинариназа II очень слабо гидролизует лихенин (табл. 2).

Надежным критерием определения типа действия глюканаз является стереохимия продуктов ферментативного гидролиза. Эндо-ферменты гидролизуют субстраты с сохранением аномерной конфигурации у продуктов гидролиза, тогда как ферменты экзо-типа действия катализируют реакции с обращением аномерной конфигурации [17].

Конфигурация продуктов гидролиза ламинарина экзо-β-1,3-глюканазами из *H. pomatia* и *Basidiomycetes* QM 806 [9, 18] была определена по изменению величины оптического вращения инкубационной смеси. Результаты наших поляриметрических измерений представлены в табл. 3. Увеличение значения оптического вращения инкубационной смеси в процессе ферментолиза β-1,3-глюканазой II с резким уменьшением этой величины при добавлении капли раствора аммиака — катализатора реакции аномеризации (ср. [9, 18]) показывает, что продуктом расщепления ламинарина является α-глюкоза. Этот вывод согласуется со сделанным ранее [19] определением аномерной конфигурации глюкозы, образующейся

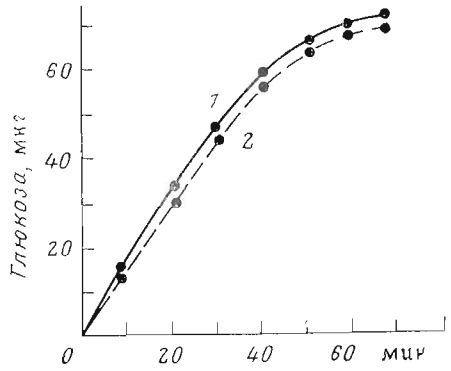

Рис. 5. Действие β-1,3-глюканазы II на ламинарин. *1* — увеличение восстанавливающей способности; *2* — увеличение количества глюкозы

при гидролизе ламинарина ламинариназой II, с использованием метода ЯМР [20].

Таким образом, выделенная в гомогенном состоянии β-1,3-глюканаза II из *E. maakii* может быть отнесена к ферментам экзо-типа действия.

Экспериментальная часть

Использовали ламинарин из *Laminaria cycharioides*, полученный по методу [21]; лихенин и ламинарин *L. hyperborea* —коммерческие препараты фирмы Koch Light Laboratories (Англия); 4-нитрофенил-α-*D*-глюкопиранозид, 4-нитрофенил-β-*D*-глюкопиранозид — коммерческие препараты фирмы Chemapol (Чехословакия); периодатно-окисленный и периодатно-окисленный, а затем восстановленный ламинарины, полученные согласно методике [14]; микрогранулированную СМ-целлюлозу СМ-32 (Whatman Biochemicals, Англия); сефадексы G-25, G-200 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция); биогель Р-150 (Bio-Rad Laboratory, США).

Концентрацию белка в растворе находили методом Лоури [22]. При тестировании фракций с колонки выход белка контролировали измерением адсорбции при 280 нм. Количество глюкозы, образующейся в инкубационных смесях, определяли глюкозооксидазным методом [13] с использованием набора ТСМ-1 фирмы Boehringer (ФРГ). β-1,3-Глюканазную активность устанавливали по возрастанию количества восстанавливающих сахаров (по методу Нельсона [12]) в смеси, содержащей 0,3 мл раствора ламинарина (500 мкг/мл) в 0,1 М ацетатном буфере (pH 5,2), 0,15 мл воды, 0,05 мл ферментного раствора, после инкубации в течение 20 мин при 37°. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, дающее 1 мкмоль глюкозы в 1 мин при условиях определения (37°; 0,01—0,1 ацетатный буфер, pH 5,2). Специфическую активность определяли как число единиц активности на 1 мг белка.

Выделение фермента проводили при 4°. Желудочно-кишечный тракт улиток тщательно растирали с силикагелем и экстрагировали двумя объемами 0,1 М ацетатного буфера (pH 5,2). После центрифугирования (20 мин; 12 000 об/мин) супернатант (концентрация белка *с* 9 мг/мл) использовали в качестве исходного препарата [10]. Для удаления низкомолекулярных примесей и перевода в необходимый буфер ферментный препарат пропускали через колонку (3 × 60 см) с сефадексом G-25, уравновешенную 0,01 М ацетатным буфером, pH 4,5. Хроматографию на СМ-целлюлозе (СМ-32) осуществляли на колонке (1,5 × 30 см), уравновешенной 0,01 М ацетатным буфером, pH 4,5. Белок элюировали линейным градиентом NaCl от 0 до 0,2 М (каждого по 750 мл), собирая фракции по 12 мл. Результаты приведены на рис. 1. Фракции 120—130 (пик II) после концентрирования на СМ-целлюлозе (колонка 1 × 6 см, уравновешена 0,01 М ацетатным буфером, pH 4,5; элюция 0,5 М NaCl) наносили на колонку (2,5 × 90 см) с биогелем Р-150, уравновешенную 0,1 М ацетатным буфером, pH 5,2. Результаты разделения приведены на рис. 2 и в табл. 1.

Дисковый электрофорез осуществляли при двух различных pH, согласно условиям, описанным в работах [23, 24]. Обнаружение белка проводили по методу [25] с кумасси бриллиантовым голубым. Активность на электрофореграммах проявляли по методу [26] с хлористым трифенилтетразолием, а также по методу [27] с глюкозооксидазным реактивом, модифицированным в применении к дисковому электрофорезу следующим образом:

после окончания электрофореза столбики геля инкубировали 30 мин при 37° в растворе ламинарина (4 мг/мл) в 0,1 М ацетатном буфере, pH 5,2; после инкубации столбики геля отмывали водой и заливали раствором № 4 набора ТСМ-1 для определения глюкозы глюкозооксидазным методом.

Оптическое вращение определяли в кварцевой кювете на поляриметре Perkin-Elmer-141. К 1,2 мл водного раствора субстрата приливали 0,4 мл (*с* 0,12 мг/мл) фермента в 0,1 М ацетатном буфере (pH 5,2) и проводили замеры оптического вращения через определенные промежутки времени. После последнего замера добавлена капля раствора аммиака и определено оптическое вращение полученной смеси. Результаты приведены в табл. 3.

Молекулярный вес ламинариназы II определяли методом тонкослойной гель-фильтрации на сефадексе G-200 (superfine) в 0,1 М ацетатном буфере, pH 5,2, с 0,2 М NaCl [28]. Местоположение белков устанавливали прокрашиванием бумажной реплики кумасси бриллиантовым голубым [29]. В качестве стандартов использовали белки с известными молекулярными весами (набор MSH, ФРГ): миоглобин, альбумины куриного белка и сыворотки крови быка, ферритин. Величины R_f белков были соответственно 0,35; 0,47; 0,53; 0,81; R_f ламинариназы II составлял 0,6, что соответствует M 100 000.

Действие ламинариназы II на ламинарин. 0,3 мл водного раствора ламинарина из *L. cycharioides* (500 мкг/мл) смешивали с 0,1 мл 0,1 М ацетатного буфера (pH 5,2) и 0,1 мл (*с* 0,06 мг/мл) раствора фермента и инкубировали при 37°. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты по 0,25 мл для определения восстанавливающей способности [12] и количества глюкозы в инкубационной смеси [13]. Результаты приведены на рис. 5.

Действие ламинариназы II на модифицированные субстраты и лихенин. Все концентрации субстратов были одинаковы (по определению фенол-серноки слотным методом [30]) и составляли 400 мкг/мл. 0,3 мл водного раствора субстрата, 0,1 мл (*с* 0,024 мг/мл) раствора фермента в 0,1 М ацетатном буфере (pH 5,2) смешивали с 0,1 мл 0,1 М ацетатного буфера (pH 5,2) и инкубировали 30 мин при 37°. Результаты приведены в табл. 2.

Зависимость активности и стабильности ламинариназы II от pH. pH-Оптимум определяли в интервале pH 3,6—8,0 в 0,1 М ацетатном или фосфатном буферах при концентрации ламинарина 1 мг/мл. Температура инкубации 37°, время инкубации 30 мин.

Для определения зависимости «pH — стабильность» аликвоты фермента (0,1 мл; *с* 0,024 мг/мл) инкубировали в указанных выше буферных растворах в течение 1, 3 и 6 ч при 37°. Затем добавляли 0,3 мл раствора ламинарина (1 мг/мл) в 0,1 М ацетатном буфере (pH 5,2) с 0,2 М NaCl и 0,1 мл этого же буфера и смесь инкубировали 30 мин при 37°. Активность определяли методом Нельсона [12]. Результаты приведены на рис. 3*а* и *б*.

Зависимость активности и стабильности ламинариназы II от температуры. Температурный оптимум определяли в интервале 25—65° при концентрации ламинарина 1 мг/мл; время инкубации 30 мин. Для исследования стабильности аликвоту раствора фермента (0,1 мл; *с* 0,024 мг/мл) в 0,1 М ацетатном буфере (pH 5,2) с 0,2 М NaCl предварительно выдерживали 30 мин при 25—65° с интервалами в 10°, а затем добавляли 0,3 мл раствора ламинарина (1 мг/мл) в 0,1 М ацетатном буфере (pH 5,2) с 0,2 М NaCl и 0,1 мл этого же буфера и смесь инкубировали 30 мин при 37°. Активность определяли методом Нельсона [12]. Результаты приведены на рис. 4*а* и *б*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kobayashi Y., Tanaka H., Ogasawara N. (1974) Agr. and Biol. Chem., **38**, 959—978.
2. Fleet G. H., Phaff H. J. (1974) J. Biol. Chem., **249**, 1717—1728.
3. Manners D. J., Marshall J. J. (1973) Phytochemistry, **12**, 547—553.

4. Manners D. J., Wilson G. (1976) Carbohydr. Res., 48, 255—264.
5. Huotari F. I., Nelson T. E., Smith F., Kirkwood S. (1968) J. Biol. Chem., 243, 952—956.
6. Fleet G. H., Phaff H. J. (1975) Biochim. et biophys. acta, 401, 318—332.
7. Muchmoore A. V., Epel D., Weaver A. M., Schimke R. T. (1969) Biochim. et biophys. acta, 178, 551—560.
8. Sova V. V., Elyakova L. A. (1972) Biochim. et biophys. acta, 258, 219—227.
9. Marshall J. J., Grand R. J. A. (1975) Arch. Biochem. and Biophys., 167, 165—175.
10. Широкова Н. И., Уварова Н. И., Елякова Л. А. (1974) Химия природн. соед., 2, 222—225.
11. Reese E. T., Mandel M. (1959) Can. J. Microbiol., 5, 173—185.
12. Nelson N. (1944) J. Biol. Chem., 153, 375—381.
13. Keston A. (1956) Abstr. Paper, 129 Meeting Amer. Chem. Soc., S. 31c.
14. Nelson T. E., Scaletti J. V., Smith F., Kirkwood S. (1963) Can. J. Chem., 41, 1671—1678.
15. Marshall J. J. (1974) Carbohydr. Res., 34, 289—305.
16. Nelson T. E., Johnson J., Jantzen J., Kirkwood S. (1969) J. Biol. Chem., 244, 5972—5980.
17. Reese E. T., Maquire A. H., Parrish F. W. (1968) Can. J. Biochem., 46, 25—34.
18. Nelson T. R. (1970) J. Biol. Chem., 245, 869—872.
19. Исаков В. В., Сова В. В., Денисенко В. А., Елякова Л. А., Дзизенко А. К. (1972) IV Международный биофизический конгресс, тезисы, с. 54.
20. Eveleigh D. E., Perlin A. S. (1969) Carbohydr. Res., 10, 87—95.
21. Elyakova L. A., Zvyagintseva T. N. (1974) Carbohydr. Res., 34, 241—243.
22. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265—275.
23. Davis B. J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404—427.
24. Reisfeld R. A., Lewis U. J., Williams D. E. (1962) Nature, 195, 281—283.
25. Chrambach A., Reisfeld R. A., Wyckoff M., Zaccary J. (1967) Anal. Biochem., 20, 150—154.
26. Gabriel O., Shu Fong Wang (1969) Anal. Biochem., 27, 545—554.
27. Елякова Л. А., Акпаров В. Х. (1975) Биоорган. химия, 1, 1646—1649.
28. Andrews P. (1965) Biochem. J., 96, 595—605.
29. Rodola B. J. (1968) J. Chromatogr., 38, 61—77.
30. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton P. A., Smith F. (1956) Anal. Chem., 28, 350—356.

Поступила в редакцию
3.1.1977

После доработки
26.V.1977

EXO-β-1,3-GLUCANASE FROM THE SNAIL *EULOTA MAAKII*

ELYAKOVA L. A., SHIROKOVA N. I.

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

β-1,3-Glucan-glucanohydrolase (EC 3.2.1.6), homogeneous according to polyacrylamide gel electrophoresis, was isolated from the digestive tract of the snail *Eulota maakii* by means of ion-exchange chromatography on CM-cellulose followed by gel filtration on Bio-Gel P-150. The pH and temperature optima of enzymatic activity are 5.2 and 55°, respectively. The enzyme stability is preserved over the pH range 4-7 as well as on heating for 30 min at 50°. The isolated β-1,3-glucanase was shown to belong to enzymes which manifest the activity of exo-type.