



УДК 577.154.36.07:543.544

**ВЫДЕЛЕНИЕ N-АЦЕТИЛ- $\beta$ -D-ГЕКСОЗАМИНИДАЗЫ  
И СОПУТСТВУЮЩИХ ГЛИКОЗИДАЗ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ  
МЕТОДОМ ГИДРОФОБНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

*Вафина М. Г., Молодцов Н. В., Сундукова Е. В.,  
Артюков А. А.*

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

На синтезированных гидрофобных сорбентах, представляющих N-бензоиламиногептиламин, присоединенный к активированной трихлортриазином сефарозе 4В или ультрагелю АсА-34, проведена частичная очистка N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазы и сопутствующих гликозидаз из экстрактов тканей животных и грибов. Получены ферментные препараты, содержащие очищенную в 8–40 раз N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазу с выходом до 85%. Адсорбированный фермент активен и может применяться как иммобилизованная N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидаза. Ипользованный метод гидрофобной хроматографии гликозидаз может быть использован при выделении индивидуальных гликозидаз из различных источников.

N-Ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидаза (КФ 3.2.1.52) — одна из наиболее распространенных в живых организмах гликозидаз. К настоящему времени этот фермент выделен из самых разнообразных источников: из тканей человека [1], животных [2], из растений [3], грибов [4], микроорганизмов [5] и т. д. Как правило, при выделении и очистке N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидаз используются классические методы: осаждение сульфатом аммония, ионообменная хроматография, гель-фильтрация, электрофорез. В последнее время для этих целей применяют аффинную хроматографию на природных сорбентах типа конканавалина А [6], на синтетических сорбентах [7] или используют оба типа сорбентов [8].

Нами предложен метод выделения и частичной очистки N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазы на синтезированных гидрофобных сорбентах [9], представляющих собой монобензоилированный гептаметилендиамин, связанный с активированной трихлортриазином сефарозой 4В (гидрофобный сорбент 1, ГС-1) и ультрагелем АсА-34 (ГС-2).

Предварительные исследования показали, что N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидаза и ряд других гликозидаз из различных источников в значительной степени, а возможно и количественно, адсорбируются гидрофобными сорбентами ГС-1 и ГС-2 при pH 5,0. Протеазы (пепсин, трипсин, химотрипсин, папаин), напротив, не задерживаются сорбентами, так же как и лизоцим и бычий сывороточный альбумин.

Оба сорбента ведут себя в отношении сорбции N-ацетил- $\beta$ -D-гексозаминидазы практически идентично, однако емкость ГС-2 (50–100 мг белка/мл) в 4–5 раз больше, чем емкость ГС-1 (10–20 мг белка/мл). По-видимому, это связано с изменениями размеров пор основы матрицы при изменении ионной силы, а также в присутствии органических рас-

творителей при синтезе сорбентов. В растворах большой ионной силы или в присутствии дегидратирующих растворителей, каким является ацетон и диоксан, сефароза 4В очень уменьшается в объеме и соответственно значительно уменьшаются размеры пор. Поэтому при приготвлении сорбента ГС-1 лиганд присоединяется в основном вблизи поверхностного слоя частиц геля и внутренняя часть геля, не содержащая лиганда, практически не сорбирует гликозидаз. Ультрагель АсА-34, представляющий собой стабилизированную полиакриламидом сефарозу, почти не изменяет своего объема, и при получении сорбента ГС-2 лиганд распределяется не только на поверхности, но и внутри всей гранулы геля. Поры геля позволяют входить внутрь глобулы достаточно большим молекулам белка, и в качестве сорбента работает вся глобула геля целиком. При этом значительно возрастает емкость гидрофобного сорбента.

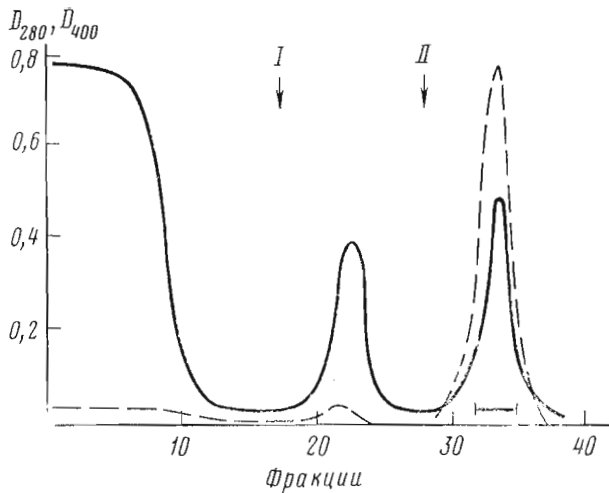
Мы изучили поведение при гидрофобной хроматографии N-ацетил-β-D-гексозаминидаз из следующих источников: гексозаминидаз А и В человека из ткани печени, разделенных предварительно на DEAE-целлюлозе [10]; суммарного экстракта печени человека; экстрактов плодовых тел высших грибов — ольховика, дереворазрушающего гриба *Hohenbuecheha serotina*, произрастающего в Приморье, и дискомицета *Sarcoscypha coccinea*; экстрактов тканей печени беспозвоночных: морского гребешка *Patinopecten yessoensis*, асцидий *Halocynthia aurantium* и *H. roretzi*, брюхоногого моллюска *Acmaea pallida*. Во всех случаях N-ацетил-β-D-гексозаминидаза практически количественно адсорбировалась гидрофобными сорбентами при рН 5,0. Однако N-ацетил-β-D-гексозаминидаза из клеток асцитной опухоли Эрлиха адсорбируется при рН 5,0 только частично, а полностью — при рН 7,0. По-видимому, это связано с присутствием в экстракте клеток асцитной опухоли Эрлиха резко различающихся между собой изоформ этого фермента. Предварительное изучение сорбированной и несорбированной при рН 5,0 гексозаминидаз из этого источника показало сходство сорбированной гексозаминидазы с гексозаминидазой А человека и высокую ее специфичность к N-ацетил-*n*-нитрофенил-β-D-глюкозаминиду. Гексозаминидаза экстракта, не сорбирующаяся на гидрофобном сорбенте при рН 5,0, оказалась способной расщеплять помимо N-ацетил- также и N-бутироил-*n*-нитрофенил-β-D-глюкозаминид.

N-Ацетил-β-D-гексозаминидаза, адсорбированная на гидрофобных сорбентах, не теряет своей активности в сорбированном состоянии. Иммобилизация обратима, и после элюции как сорбент, так и N-ацетил-β-D-гексозаминидаза легко регенерируются.

Элюцию N-ацетил-β-D-гексозаминидазы с сорбентов ГС-1 и ГС-2 осуществляют 50% раствором этиленгликоля в 0,05 М фосфатном буфере (рН 5,0), содержащем 0,5 М NaCl (рисунок). Использование буферного раствора без NaCl приводит к «размыванию» пика фермента и элюции его в большем объеме, а в некоторых случаях и к значительному уменьшению выхода. Возможно, это происходит вследствие того, что высокая концентрация соли способствует меньшей гидратации белковой молекулы, меньшей степени ее разворачивания и соответственно меньшей степени денатурации белка в присутствии этиленгликоля.

В качестве элюента мы применяли также 20% раствор метилцеллозоля в том же буфере с NaCl или 50% глицерин. Глицерин весьма неудобен в работе из-за большой вязкости его растворов. Метилцеллозоль, хотя и дает растворы с меньшей вязкостью, чем этиленгликоль, обладает большей инактивирующей способностью по отношению к N-ацетил-β-D-гексозаминидазам из некоторых источников, например из ткани печени акмеи. В то же время при выделении гексозаминидазы из *H. serotina* при использовании метилцеллозоля выход по активности составлял 70% при очистке в 10 раз по сравнению с экстрактом.

Как правило, растворы N-ацетил-β-D-гексозаминидаз в 50% забуференном растворе этиленгликоля при рН 5,0 за 30–45 мин при 20° почти



Хроматографирование экстракта печени человека (100 мг белка) на ГС-1 (колонка 1,2×12 см): 1 — 280 нм, 2 — активность *N*-ацетил- $\beta$ -*D*-гексозаминидазы (440 нм); стрелками обозначены начало промывания колонки буферным раствором, pH 5,0, с 1 М NaCl (I) и 50% раствором этиленгликоля в том же буфере с 0,5 М NaCl (II). Объем фракций 2 мл

не теряли своей активности, однако со временем скорость инактивации возрастала очень быстро. Поэтому необходимо было возможно скорее избавиться от этиленгликоля и перевести фермент в подходящий буферный раствор. Наиболее удобно это осуществить с помощью гель-фильтрации на колонках с сефадексом G-25 или G-50. Выход гексозаминидазы после этой стадии по активности достигает 85%, для некоторых менее стабильных гексозаминидаз выход значительно ниже, даже если хроматографию проводить при 4°. Возможно, это объясняется денатурирующим воздействием этиленгликоля. Очистка гексозаминидаз достигает 4–40 раз (табл. 1). Повторная хроматография на гидрофобных сорбентах, хотя и приводит еще к 1,5-кратной очистке, однако вследствие потерь делает эту повторную операцию нецелесообразной. Полученные после гель-фильтрации препараты фермента, как правило, представляют собой прозрачные растворы (~2 мг белка/мл), содержащие наряду с *N*-ацетил- $\beta$ -*D*-гексозаминидазой другие гликозидазы, присутствовавшие в исходном экстракте (табл. 2).

Способность *N*-ацетил- $\beta$ -*D*-гексозаминидаз, а также ряда гликозидаз обратимо адсорбироваться на гидрофобных сорбентах в одинаковых условиях свидетельствует о наличии в их молекулах гидрофобной области, имеющей более или менее сходное строение. Это может также свидетельствовать и об эволюционной общности этого большого и важного класса гликозид-гидролаз, дифференциация которых в отношении специфичности к гликопной части шла постепенно при появлении необходимых предпосылок.

Как видно из изложенного, метод гидрофобной хроматографии экстракта тканей различных организмов и частично очищенных препаратов карбогидраз весьма прост в исполнении, универсален и с хорошими выходами приводит к препарату гликозидаз и *N*-ацетил- $\beta$ -*D*-гексозаминидазы, при этом достигается очистка за одну стадию до 40 раз. Исключением является, например, *N*-ацетил- $\beta$ -*D*-гексозаминидаза из акмеи, но вследствие лабильности этой гексозаминидазы ее удается получить и при использовании классических методов очистки, также с весьма небольшими выходами.

Выделение N-ацетил-β-D-гексозаминадазы из различных источников методом гидрофобной хроматографии  
Данные после гель-фильтрации

Исходный препарат	Удельная активность мкмоль/мг·мин	Степень очистки	Выход, %	Сорбент
N-Ацетил-β-D-гексозаминадаза А печени человека	3,65	10	60	ГС-1
N-Ацетил-β-D-гексозаминадаза Б печени человека	1,4	7,5	82	ГС-1
Печень человека	0,96	12	71	ГС-1, ГС-2
<i>Sarcosipha coccinea</i>	12	18,5	80	ГС-2
<i>Patinopecten yessoensis</i>	2,46	4	85	ГС-2
<i>Pohenbuechelia serotina</i>	2,2	40	40	ГС-2
<i>Halocynthia aurantium</i>	6,1	3,5	10	ГС-1
<i>Halocynthia roretzi</i>	21	7	50	ГС-1
<i>Actaea pallida</i>	8,7	10	10	ГС-1

Таблица 2

Выделение N-ацетил-β-D-гексозаминадазы и сопутствующих гликозидаз на ГС-1 из экстракта *Halocynthia roretzi*  
Содержание различных гликозидаз (в %) к N-ацетил-β-D-глюкозаминидазе в первоначальном экстракте и в элюате после гидрофобной хроматографии и гель-фильтрации на G-25

Гликозидаза	Экстракт	ГС-1	Гликозидаза	Экстракт	ГС-1
N-Ацетил-β-D-глюкозаминидаза	100	100	β-Глюкозидаза	1,4	1,7
N-Ацетил-β-D-галактозаминидаза	56,6	53	α-Галактозидаза	2,8	5
α-Глюкозидаза	1,0	0,8	β-Галактозидаза	6,0	6,4
			α-Маннозидаза	1,2	1,1

Таким образом, метод гидрофобной хроматографии может быть использован как одна из предварительных стадий при выделении индивидуальных гликозидаз из различных источников, а также для концентрирования гликозидаз из их весьма разбавленных растворов, так как при элюции с гидрофобного сорбента гликозидазы элюируются в очень небольшом объеме.

### Экспериментальная часть

*Субстраты* были синтезированы по следующим методикам: *n*-нитрофенил-α-глюко-, галакто- и ксилозиды [11], их β-аномеры [12], *n*-нитрофенил-α-D-маннозид [13], *n*-нитрофенил-β-D-глюкозаминид и -галактозаминид [14] и *n*-нитрофенил-α-D-глюкозаминид [15].

*Определение активности.* К 0,2 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 4,0), содержащего 0,3 мМ субстрат, прибавляли 0,1 мл раствора ферментного препарата, реакционную смесь инкубировали при 37° 5–20 мин при использовании N-ацетил-*n*-нитрофенил-β-D-глюкозаминида или -галактозаминида или 45–60 мин при использовании других гликозидов. Реакцию останавливали прибавлением 1 мл 0,5 М раствора Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и освобождающийся *n*-нитрофенол определяли при 400 или 440 нм. Удельную активность фермента рассчитывали по количеству микромолей *n*-нитрофенола, отщепленного от субстрата за 1 мин в расчете на 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури, в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

*2,4-Дихлор-симм-триазинилагароза.* К суспензии 25 мл сефарозы 4В в 20 мл дистиллированной воды при энергичном перемешивании прибав-

ляли 1 г (5,4 ммоль) трихлортриазина в 25 мл ацетона, рН смеси доводили 1 М NaOH до  $8,5 \pm 0,5$  и поддерживали это значение рН до окончания реакции в течение 3–10 мин при 4°. Об окончании реакции активации свидетельствует резкое изменение рН реакционной среды в щелочную область (выше 9) от прибавления небольшого избытка NaOH. Суспензию быстро выливали в равный объем 25%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , фильтровали и промывали на фильтре 100 мл холодного 50% водного ацетона и 300 мл дистиллированной воды. Для анализа аликвоту полученного геля высушивали в вакууме над  $\text{P}_2\text{O}_5$  до постоянного веса. Найдено, %: С 44,21; Н 5,02; N 1,76; Cl 2,08. Это соответствует замещению каждого 15–20-го углеводного остатка полисахарида.

*2-Аминогептилимино-4-хлор-симм-триазинилагароза.* К раствору 2 г (15 ммоль) гептаметилендиамина в 20 мл 0,7 М раствора  $\text{NaHCO}_3$  прибавляли 25 мл 2,4-дихлор-симм-триазинилагарозы, смесь перемешивали 1 ч при 18°, отфильтровывали и гель отмывали дистиллированной водой от амина до отрицательной реакции фильтрата с нингидрином. Отмытый гель содержит 7–12 мкмоль лиганда в 1 мл.

*2-Аминогептилимино-4-окси-симм-триазинилагароза.* Гидролиз 4-хлор-производного проводили 0,5 М раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (рН 10,2) 30 мин при 20°. В отмытом геле после такой обработки не содержится хлора.

*2-N-бензоиламиногептилимино-4-окси-симм-триазинилагароза. А.* К раствору 0,25 г (2 ммоль) бензойной кислоты в 2 мл метанола прибавляли 25 мл 2-аминогептилимино-4-оксипроизводного агарозы в 40 мл 40% водного диоксана и 0,8 г (4 ммоль)  $\text{N,N}'$ -дициклогексилкарбодимида, смесь перемешивали 12 ч при 20°, сорбент отфильтровывали и промывали 300 мл 50% водного метанола, 100 мл 50% водного ацетона и 300 мл дистиллированной воды.

*Б.* К охлаждаемой суспензии 25 мл 2-аминогептилимино-4-оксипроизводного в 20 мл 0,5 М  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (рН 10) прибавляли по каплям при интенсивном перемешивании 1,2 г (1 мл, 8,6 ммоль) хлористого бензоила (1 ч, 4°), смесь перемешивали 16 ч, отфильтровывали гель и промывали 150 мл 50% водного метанола и 300 мл дистиллированной воды. Получали гидрофобный сорбент ГС-1. После бензонирования как по методу А, так и по методу Б в сорбенте полностью отсутствуют свободные аминогруппы.

Аналогично на основе ультрагеля АсА-34 (ЛКВ, Швеция) получали гидрофобный сорбент ГС-2 (7–12 мкмоль лиганда/мл).

*Хроματοграфия ферментных препаратов.* Экстракт ткани животных или грибов доводили до рН 5,0, центрифугировали 10 мин при 15 000 g и наносили на колонку с гидрофобным сорбентом из расчета 10–20 мг суммарного белка на 1 мл ГС-1 или 50–100 мг белка на 1 мл ГС-2, предварительно уравновешенных с 0,05 М фосфатным буфером (рН 5,0). Колонку промывали тем же буфером до исчезновения белка в промывных водах и затем последовательно тем же буфером, содержащим 1 М NaCl (до прекращения поглощения при 280 нм) и 50% этиленгликолем в том же буфере с 0,5 М NaCl. Фракции, проявляющие активность, составляющую не менее 50% от максимальной активности пика, объединяли и немедленно подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-50 в 0,05 М фосфатном буфере, рН 5,0. Вся работа проводилась при 20°.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Robinson D., Stirling J. L. (1968) *Biochem. J.*, **107**, 321–327.
2. Виха Г. В., Каверзнева Е. Д., Хорлиа А. Я. (1971) *Биохимия*, **36**, 33–42.
3. Bahl O. P., Agrawal K. M. L. (1958) *J. Biol. Chem.*, **243**, 98–102.
4. Kilpatrick D. C., Stirling J. L. (1975) *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 246–247.
5. Yen D. W., Wu H. C. (1976) *J. Bacteriol.*, **125**, 324–331.
6. Cohen C. M., Weismann G., Hoffstein S., Awasthi Y. C., Srivastava S. K. (1976) *Biochemistry*, **15**, 452–460.
7. Grebner E. E., Parikh J. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **350**, 437–441.
8. Geiger B., Arnon R. (1976) *Biochemistry*, 3484–3493.

9. Артюков А. А., Молодцов Н. В. Положительное решение по заявке 2460959 от 10.03.1977 г.
10. Sandhoff K., Wässle W. (1971) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 352, 1119-1133.
11. Helferich B. (1944) Chem. Ber., 77, 194-197.
12. Seidmann M., Link K. P. (1950) J. Amer. Chem. Soc., 72, 4325-4332.
13. Westphal O., Feier H. (1956) Chem. Ber., 89, 582-588.
14. Зурабян С. Э., Волосюк Т. Р., Хорлин А. Я. (1968) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1612-1614.
15. Dale J. K. (1929) J. Amer. Chem. Soc., 51, 2788-2795.

Поступила в редакцию  
25.X.1978

## ISOLATION OF N-ACETYL- $\beta$ -D-HEXOSAMINIDASE AND ACCOMPANYING GLYCOSIDASES FROM DIFFERENT SOURCES BY HYDROPHOBIC CHROMATOGRAPHY

VAFINA M. G., MOLODTSOV N. V., SUNDUKOVA E. V., ARTYUKOV A. A.

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

N-Acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase and accompanying glycosidases from extracts of animal tissues and mushrooms were purified by hydrophobic chromatography on the synthetic sorbents made of N-benzoylaminoheptylamine coupled to trichlorotriazine activated Sepharose 4B or Ultrogel AcA-34. The title enzyme, purified 8-40 fold, was obtained in 85% yield. The adsorbed enzyme retained its activity and might find an application as immobilized N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase. The described method of glycosidase hydrophobic chromatography might be utilized for isolating individual glycosidases from various sources.

---