

Г. Я. ВИДЕРШАЙН

## РАЗЛИЧНЫЕ ФОРМЫ ГЛИКОЗИДАЗ ИЗ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ПОЧЕК СВИНЬИ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 16 VII 1971)

В последние годы получены экспериментальные данные о поразительной специфичности гликозидаз, зависящей от природы моносахаридного остатка, типа связи и других особенностей структуры молекулы субстрата<sup>(1)</sup>.

Нам, например, удалось показать, что препараты  $\alpha$ -*L*-фукозидазы из почки свиньи, гидролизующие синтетический *n*-нитрофенил- $\alpha$ -*L*-фукозид, не отщепляют *L*-фукозу от молекул группового вещества крови ( $A + H$ )<sup>(2)</sup>. Позднее было обнаружено, что фукозосодержащие фрагменты, полученные при щелочной деструкции нативных групповых веществ крови, являются субстратами для  $\alpha$ -*L*-фукозидазы<sup>(3, 4)</sup>.

Разнообразие углеводсодержащих соединений и их активный обмен в организме, с одной стороны, и строгая специфичность действия гликозидаз, с другой, ставят вопрос о существовании различных видов этих ферментов.

В настоящем сообщении приводятся данные о различных формах  $\alpha$ -*L*-фукозидазы,  $\beta$ -*D*-галактозидазы и  $\alpha$ -*D*-галактозидазы — группы гликозидаз из ферментного препарата почки свиньи.

В качестве субстратов использовали *n*-нитрофенил- $\alpha$ -*L*-фукозид, *n*-нитрофенил- $\beta$ -*D*-галактозид, *n*-нитрофенил- $\alpha$ -*D*-галактозид, лактозу и следующие фукозосодержащие олигосахариды из женского молока: 2-фукозиллактозу, лактодифукотетраозу, лакто-*N*-фукопентаозу I, лакто-*N*-фукопентаозу II, лакто-*N*-дифукогексаозу I\* и лакто-*N*-фукопентаозу III.

В качестве ферментного препарата использовали прогретую и лиофилизированную белковую фракцию между 0,40—0,52 насыщения  $(NH_4)_2SO_4$ , полученную при фракционировании гомогената из почки свиньи по методу, описанному нами ранее<sup>(2)</sup>. Активность гликозидаз определяли спектрофотометрически по количеству выделяющегося при ферментативном гидролизе *n*-нитрофенола при 400 мμ. О ферментативном расщеплении лактозы и фукозосодержащих олигосахаридов судили по определению в смеси свободной глюкозы<sup>(5)</sup> и фукозы<sup>(6)</sup> соответственно.

При гель-фильтрации ферментных препаратов на колонке с сефадексом Г-200 использовали три последовательно соединенные колонки (100 × 1,8 см каждая), уравновешенных 0,05 *N* ацетатным буфером pH 5,0 с 1 мМ ЭДТА. Лиофилизированный ферментный препарат, 1,25 мл (концентрация белка 500 мг/мл) наносили на колонку. Скорость элюции 5,6 мл/час. Объем фракции 1,8 мл.

На рис. 1 приведен элюционный профиль  $\alpha$ -*L*-фукозидазы,  $\beta$ -*D*-галактозидазы и  $\alpha$ -*D*-галактозидазы при гель-фильтрации ферментного препарата из почки свиньи на колонке с сефадексом Г-200. Как видно из рис. 1,  $\alpha$ -*L*-фукозидаза,  $\beta$ -*D*-галактозидаза и  $\alpha$ -*D*-галактозидаза дают при элюции с колонки соответственно два, четыре и два пика активности.

\* Все олигосахариды получены из лаборатории доктора А. Гауе, Институт Макса Планка, Гейдельберг, ФРГ; лакто-*N*-фукопентаоза III — из лаборатории доктора В. Гинзбурга, Институт здоровья, Бетезда, США.

Сравнительное изучение активностей  $\beta$ -D-галактозидазы при использовании в качестве субстрата лактозы показало (рис. 1), что расщепление этого дисахарида происходит во фракциях, соответствующих только трем пикам. Лактоза практически не расщеплялась во фракциях, соответствующих четвертому пику и обладающих наибольшей  $\beta$ -D-галактозидазной активностью по синтетическому субстрату.

Более подробно нами были изучены сравнительные свойства разделенных на сефадексе  $\alpha$ -L-фукозидазных активностей, обозначенных как  $\alpha$ -L-фукозидаза I и  $\alpha$ -L-фукозидаза II.

При изучении влияния pH на активность  $\alpha$ -L-фукозидазы I и  $\alpha$ -L-фукозидазы II оказалось, что оптимум pH для этих ферментов совпадает и равен примерно 5,25. Однако изменение активности при других значениях

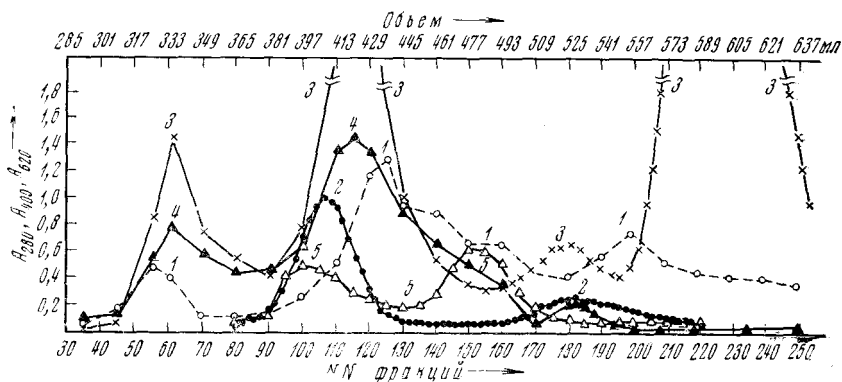


Рис. 1. Элюционный профиль различных гликозидаз при гель-фильтрации ферментного препарата из почек свиньи на колонках с сефадексом Г-200. 1 — белок, 2 —  $\alpha$ -L-фукозидаза, 3, 4 —  $\beta$ -D-галактозидаза (по галактозиду и лактозе, соответственно), 5 —  $\alpha$ -D-галактозидаза

pH происходит для обеих форм фермента совершенно различно. Так, например, остаточная активность фукозидазы I при pH 3,5; 4,0 и 4,5 составляет соответственно 38; 65 и 85 % от активности фермента в оптимуме pH. При этих же значениях pH остаточная активность для фукозидазы II составляет лишь 23, 40 и 65 %. Еще более заметным был характер изменения активности фукозидаз при хранении препаратов при различных pH. Фукозидаза I оказалась более стабильна при хранении в области pH от 4,5 до 5,5 (остаточная активность фукозидазы I в этих условиях составляла 65 %). Фукозидаза II, наоборот, была более стабильна при хранении в области pH 5,5—6,0 и теряла примерно 80 % исходной активности при pH 4,0—4,75.

Существенные различия между фукозидазой I и II были обнаружены при изучении термостабильности этих ферментов. Прогревание препарата фукозидазы I при температуре 45°, 50, 55° и 60° в течение 10 мин. совершенно не изменяло ее активность. В этих же условиях активность фукозидазы II снижалась на 35—55 %.

При изучении специфичности  $\alpha$ -L-фукозидазы I и  $\alpha$ -L-фукозидазы II показано, что обе фукозидазы в условиях инкубации (7 час.) полностью расщепляли синтетический *p*-нитрофенилфукозид и в различной степени отщепляли фукозу от 2-фукозиллактозы, лактодифукотетраозы и лакто-N-фукопентаозы II. Оба препарата не отщепляли фукозу от лакто-N-фукопентаозы I и лакто-N-дифукогексаозы I.

При использовании в качестве субстрата лакто-N-фукопентаозы III оказалось, что фукоза от этого олигосахарида отщепляется  $\alpha$ -L-фукозидазой I и не отщепляется  $\alpha$ -L-фукозидазой II.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в ферментных препаратах из почки свиньи существуют две формы  $\alpha$ -L-фукозидазы, отличающиеся друг от друга по ряду свойств и субстратной специ-

фичности, четыре формы  $\beta$ -D-галактозидазы и две формы  $\alpha$ -D-галактозидазы.

Пока трудно оценить роль и взаимоотношение различных форм гликозидаз. Можно предполагать, что распад в клетке различных по структуре углеводсодержащих соединений осуществляется высокоспециализированными ферментами, значение которых выяснится в ходе дальнейших экспериментов.

Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР  
Москва

Поступило  
15 VII 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> W. M. Watkins, In: Glycoproteins, Amsterdam — London — N. Y., 1966.  
<sup>2</sup> Г. Я. Видершайн, Е. Л. Розенфельд, Биохимия, **32**, 173 (1967). <sup>3</sup> G. Y. Wiederschain, E. L. Rosenfeld, Bull. Soc. Chim. Biol., **51**, 1075 (1969).  
<sup>4</sup> Г. Я. Видершайн, Л. М. Лихошерстов, С. Н. Сенченкова, Биохимия, **35**, 831 (1970). <sup>5</sup> И. С. Лукомская, В. К. Городецкий, Биохимия, **26**, 477 (1961). <sup>6</sup> Г. Я. Видершайн, Л. Г. Колибаба, Вопр. мед. хим., **15**, 637 (1969).