



УДК 577.152.321'134

О ТОПОГРАФИИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ЦЕЛЛОБИАЗЫ
ИЗ *ASPERGILLUS TERREUS*Буачидзе Т. Ш., Чиргадзе Л. Т., Нуцубидзе Н. Н.,
Квеситадзе Г. И.

Институт биохимии растений Академии наук ГССР, Тбилиси

Изучен механизм торможения реакции гидролиза целлобиозы, катализируемой целлобиазой, лактонами разной структуры. Вычислены кинетические параметры этого процесса, на основании которых сделаны предположения о некоторых аспектах функционирования фермента и о топографии его активного центра. Констатируется, что лактоны с успехом могут быть использованы как инструменты для изучения механизма действия ферментов целлюлазного комплекса, в частности целлобиазы.

В ферментативном гидролизе целлюлозы участвуют следующие ферменты целлюлазного комплекса: эндо-1,4-β-глюканаза (КФ 3.2.1.4), экзо-1,4-β-D-глюканцеллобиогидролаза (КФ 3.2.1.91), экзо-1,4-β-4-глюкозидаза (КФ 3.2.1.74), целлобиаза (β-глюкозидаза, КФ 3.2.1.21) [1–3]. Целлобиаза катализирует гидролиз целлобиозы и других низкомолекулярных целлоолигосахаридов до глюкозы. Известно, что лактоны являются ингибиторами реакции, катализируемой целлобиазой [4, 5]. Установлено, что глюконолактонами можно селективно тормозить активность целлобиазы и таким путем судить об активности других ферментов целлюлазного комплекса [5, 6]. Так, используя этот метод, авторы определяли активность экзо-1,4-β-глюкозидазы. Было также показано, что глюконолактон практически не влияет на активность эндоглюканаза из различных произвольно выбранных источников и селективно ингибирует целлобиазную активность всех изученных ферментных препаратов [5]. Применяя лактоны, удалось оценить сравнительную роль экзо-1,4-β-глюкозидазы и целлобиазы при ферментативном гидролизе целлюлозы и сделать весьма важные выводы относительно вклада этих ферментов в процессе гидролиза. Надо отметить, что при этом ингибирующий эффект изучался на примере ограниченного числа лактонов и полученные оценки носили полуколичественный характер. Так, в работе [6] дается оценка ингибирующего эффекта δ-глюконолактона и родственных соединений в реакции гидролиза целлобиозы, катализируемой целлобиазой. В целом, несмотря на наличие ряда работ, касающихся ингибирования целлобиазы лактонами, полученные данные не позволяют судить о механизме ингибирования целлобиазы.

Мы поставили задачу исследовать процесс ингибирования активности целлобиазы, выделенной из термофильной культуры *Aspergillus terreus*, лактонами разной структуры и конфигурации и, опираясь на эти данные, по возможности составить представление о топографии активного центра фермента.

При исследовании активации или ингибирования ферментативной активности какими-либо соединениями очень важно исключить другие факторы, которые могли бы исказить картину, увеличивая или уменьшая основной эффект. Так как многие гидролазы, будучи металлоферментами, активируются ионами металлов, мы исследовали влияние EDTA на активность целлобиазы в концентрации 0,1 М при 60° С. И хотя нам не известны данные, касающиеся содержания ионов металла в целлобиазах микромитозов, наличие нового термотолерантного штамма-продуцента *A. terreus* заставило нас исследовать влияние EDTA на активность целлобиазы. Было установлено, что в указанной концентрации EDTA не вызывает изменения активности целлобиазы.

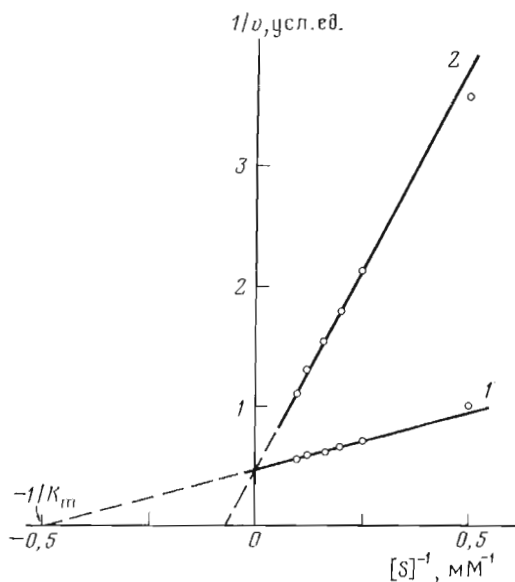


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость скорости реакции гидролиза целлобиозы, катализируемой целлобиазой *A. terreus*, от концентрации субстрата в отсутствие (1) и в присутствии 0,3 мМ глюконо-δ-лактона (2)

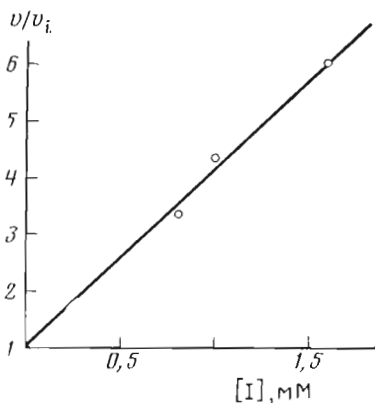


Рис. 2

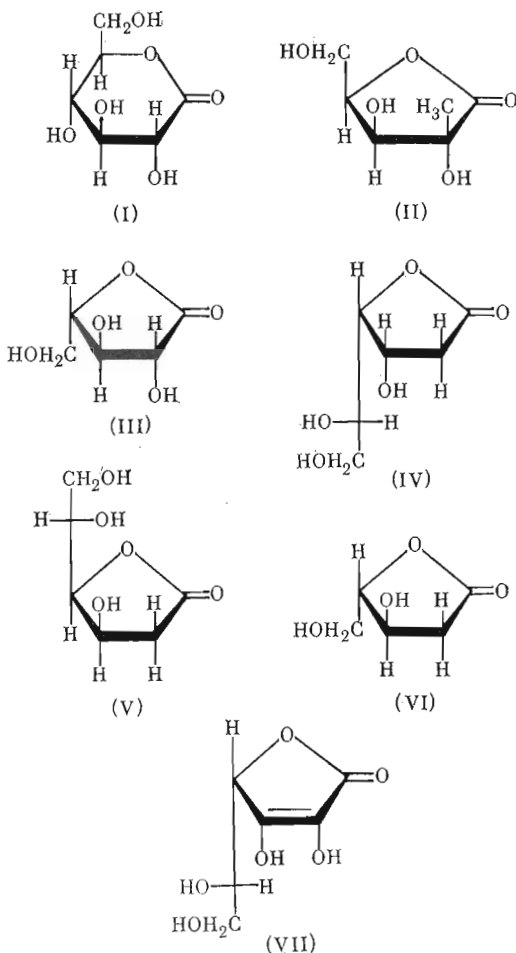
Рис. 2. Зависимость степени ингибирования целлобиазы от концентрации глюконо-δ-лактона

В дальнейшем нами были вычислены кинетические параметры реакции гидролиза целлобиозы, катализируемой целлобиазой. Константу Михаэлиса определяли по методу Лайнуивера — Бэрка. Как видно из рис. 1 (1), K_m равна $2 \cdot 10^{-3}$ М. (В литературе значения K_m для целлобиаз, полученных из *Aspergillus niger*, *Trichoderma lignorum*, *Geotrichum candidum*, варьируют в интервале 1–4 мМ [2].) Каталитическая константа (k) и константа специфичности (k/K_m) реакции гидролиза целлобиозы, катализируемой целлобиазой *A. terreus*, равны $0,05 \text{ мин}^{-1}$ и $25 \text{ М}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ соответственно. В целом это свидетельствовало о том, что целлобиаза из термофильного штамма *A. terreus* по основным кинетическим параметрам не отличается от целлобиаз мезофильных организмов.

Как известно, углеводные лактоны представляют собой внутримолекулярные ангидриды соответствующих кислот. Они могут образовываться как из альдоновых, так и из уроновых кислот. В литературе встречаются данные, указывающие на то, что в ходе кинетических экспериментов лактоны могут претерпевать химические превращения [7, 8]. В частности, δ-лактоны, содержащие шестичленное кольцо, менее стабильны, чем γ-лактоны с пятичленным кольцом, и могут спонтанно гидролизироваться. Скорость спонтанного гидролиза лактонов зависит от pH реакционной среды, причем она наиболее высока при нейтральных значениях pH инкубационной среды. Помимо этого известно, что при увеличении температуры возрастает скорость таутомерного превращения глюкозо-δ-лактона в глюконо-γ-лактон [9]. Но, как показали эксперименты, проведенные нами, а также другими авторами [5], при pH 4,5 и 55°C не происходит изменения ингибирующей способности лактонов (глюконолактоны инкубировали при 55°C и при pH 4,5 в течение 24 ч). Эти результаты дают нам право исключить возможность сколько-нибудь значительных превращений лактонов в условиях наших экспериментов.

В работе использованы лактоны разной структуры и конфигурации (соединения (I)–(VII)).

Кинетический анализ ингибирования показал, что целлобиаза из *A. terreus* Т-49 ингибируется соединениями (I)–(IV), (VI), (VII) по конкурентному типу торможения (в качестве примера на рис. 1 приведе-



- (I) — δ-лактон *D*-глюконовой кислоты,
 (II) — γ-лактон α-*D*-глюкосахариновой кислоты,
 (III) — γ-лактон *L*-арабиновой кислоты,
 (IV) — γ-лактон α-*L*-ортоглюкосахариновой кислоты,
 (V) — γ-лактон α-*D*-ортоглюкосахариновой кислоты,
 (VI) — γ-лактон 2-дезоксид-*L*-рибоновой кислоты,
 (VII) — γ-лактон аскорбиновой кислоты.

ны данные по ингибированию целлюлазы глюконо-δ-лактоном (I)). Эти результаты свидетельствуют о том, что перечисленные выше лактоны связываются в сорбционном участке активного центра целлюлазы. Такой же результат был получен в работе других авторов [5] с применением глюконолактона при ингибировании целлюлаз из ферментных препаратов из *T. reesei*, *T. longibrachiatum*, *A. foetidus*. Константы ингибирования (K_i) для целлюлаз из этих организмов равны 0,03; 0,07 и 0,1 мМ соответственно, в то время как ингибирование целлюлазной активности препарата из *T. lignorum* имеет смешанный характер (K_i 0,05 мМ) [5]. Интересно отметить полное отсутствие ингибирующих свойств по отношению к целлюлозе *A. terreus* у γ-лактона α-*D*-ортоглюкосахариновой кислоты (V).

Константы ингибирования вычисляли по известному методу [10] из тангенса угла наклона прямой в зависимости v/v_1 (v и v_1 — скорости реакции в отсутствие и в присутствии ингибитора) от концентрации ингибитора по формуле, применяемой для конкурентного типа торможения (рис. 2):

$$K_i = \frac{K_m}{\operatorname{tg} \alpha (K_m + [S])}$$

Полученные значения K_i для соединений (I)–(IV), (VI), (VII) соответственно равны 0,05; 0,37; 3,0; 0,4; 1,6 и 0,26 мМ.

Таким образом, пятичленные лактоны (II)–(VII) ингибируют целлобиазу значительно менее эффективно, чем шестичленные (I). Исходя из этого, можно предположить, что сорбционный участок активного центра целлобиазы *A. terreus* имеет протяженность по размерам, соответствующую не менее чем шестичленному циклу углевода (пиранозная форма моносахарида). Пятичленные γ -лактоны (соединения (III) и (VI)), видимо, не полностью перекрывая сорбционный участок фермента, характеризуются в сравнении с шестичленным δ -лактоном почти на два порядка пониженной степенью ингибирования.

Как видно из приведенных выше структурных формул, δ -глюконолактон (I) сходен с глюкозой в пиранозной форме, а γ -лактон (IV) — с ее фуранозной формой. При этом δ -лактон значительно эффективнее связывается с ферментом, чем γ -лактон. Известно, что в растворе глюкоза находится в основном в пиранозной форме (содержание открытой формы ничтожно мало). Глюкоза в свою очередь, как и глюконолактоны, является ингибитором целлобиазы (K_i 6 мМ) [11], и, вероятно, они конкурируют за место связывания с сорбционным центром фермента. Отсюда понятно, почему δ -лактоны как ингибиторы обладают большим сродством к целлобиазе, чем γ -глюконолактон. С другой стороны, K_i для δ -лактона намного ниже K_m для целлобиазы, т. е. δ -лактон связывается намного эффективнее, чем специфический субстрат. Можно предположить, что сорбционный участок активного центра целлобиазы имеет такую конфигурацию, что δ -лактон полностью перекрывает связывающий участок фермента. Существует и другая интерпретация того факта, что глюконолактон эффективнее ингибирует целлобиазу, чем глюкоза. Авторы работы [4] считают, что лактон медленнее высвобождается из комплекса энзим — лактон. По-видимому, более эффективное связывание лактона, чем глюкозы и целлобиазы, можно объяснить наличием более реакционноспособной карбонильной группы в лактоне. Обычно глюконолактон находится в равновесии с кислотной формой при рН 7, и при больших величинах рН равновесие сдвинуто в сторону кислоты, но при этом карбонильная группа в обоих случаях остается активной, тогда как >C=O -группа в растворе глюкозы присутствует в весьма незначительной концентрации. Следовательно, в активном центре целлобиазы находится каталитически активная группа с выраженными нуклеофильными свойствами. Шевалье [12] предполагает, что в активном центре целлобиазы находится гистидин с протонированной формой имидазольного азота и карбоксильная группа, и заключает, что катализ проходит по общекислотному механизму в две стадии: 1) отщепление агликоновой части и образование энзим-гликозильного комплекса; 2) реакция промежуточного комплекса с водой с образованием глюкозы. По-видимому, все вышесказанное не противоречит нашим предположениям о размере и структуре активного центра целлобиазы.

В целом на основе наших и литературных данных можно сделать заключение, что метод ингибирования лактонами эффективен для исследования механизма функционирования целлобиазы и других ферментов целлюлозного комплекса.

Экспериментальная часть

Соединение (I) является коммерческим препаратом фирмы Fluka. Соединение (VII) — отечественный медицинский препарат. Соединения (II)–(VI) синтезированы на кафедре высокомолекулярных соединений Тбилисского государственного университета. В качестве целлюлозного препарата применили целлотерин — частично очищенный ферментный препарат, полученный осаждением культуральной жидкости сернокислым аммонием и хроматографией на колонках с биогелем P-6 (Reanal) и ультрогелем АсА-34 (ЛКВ, Франция). В качестве субстрата использовали *D*-целлобиозу (Serva, ФРГ).

Активность целлюлазы определяли глюкозооксидазно-пероксидазным методом [13] по количеству *D*-глюкозы, образующейся в ходе ферментативной реакции. После 10-минутной инкубации фермента с субстратом к 0,2 мл исследуемого раствора добавляли 3 мл реактива, который готовили следующим образом: 50 мг глюкозооксидазы и 30 мг пероксидазы растворяли в 330 мл 0,4 М фосфатного буфера (рН 7,5) и доводили до 500 мл 0,1% раствором желтой кровяной соли (раствор хранили в темной посуде в холодильнике; устойчив в течение 7–10 сут), инкубировали 35–40 мин при 20°С, измеряли поглощение раствора при 410 нм. По заранее построенной калибровочной кривой находили количество глюкозы. При этом использовали глюкозооксидазу (КФ 1.1.3.4.) отечественного производства (уд. акт. 91 000–134 000 ед. акт./г), пероксидазу (КФ 1.11.1.7) из хрена (уд. акт. 350 000–400 000 ед. акт./г) производства фирмы Reanal (Венгрия), $K_4Fe(CN)_6$ (Союзреактив, х. ч.) и *D*-глюкозу (Союзреактив, х. ч.).

Авторы приносят благодарность сотрудникам Тбилисского государственного университета канд. хим. наук доценту Р. А. Гахокидзе и ст. научн. сотр. Н. Н. Сидамонидзе за любезно предоставленные ими образцы лактонов и обсуждение отдельных результатов работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клесов А. А., Рабинович М. Л. В сб.: Инженерная энзимология и биоорганический катализ/Ред. Кретович В. Л., Березин И. В. Итоги науки и техники. Сер. биол. химия. М.: Изд-во ВИНТИ, 1978, т. 12, с. 49–91.
2. Клесов А. А., Рабинович М. Л., Симицын А. П., Чурилова И. В., Григораш С. Ю. Биоорганич. химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1225–1242.
3. Рабинович М. Л., Клесов А. А., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1979, т. 246, с. 500–504.
4. Reese E. T., Mandels M. Research Report. Microbiol. Ser., 1957, № 17, p. 60.
5. Симицын А. П., Клесов А. А. Биохимия, 1981, т. 46, вып. 2, с. 202–213.
6. Reese E. T. Adv. Chem., Ser. 95, 1969, p. 26–33.
7. Reese E. T., Parirish F. W. Carbohydr. Res., 1971, v. 18, p. 381–388.
8. Laslo E., Hollo J., Noschka A., Sarogi G. Carbohydr. Res., 1978, v. 61, p. 387–394.
9. Нахимович Н. И. Реакции моносахаридов. М.: Госпищепромиздат, 1960, с. 16.
10. Березин И. В., Клесов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: Изд-во МГУ, 1979.
11. Козловская Л. И. β -Глюкозидазы гриба *Geotrichum candidum* ЗС. Автореф. дис. канд. биол. наук. М., Ин-т биохимии, 1980.
12. Shewale J. G. Int. J. Biochem., 1982, v. 14, p. 435–443.
13. Щербухин В. Д., Миронов Л. И., Кондырева А. В., Грюнер В. С. Прикл. биохимия и микробиол., 1970, т. 6, № 4, с. 467–470.

Поступила в редакцию
28.VII.1983
После доработки
11.X.1983

ON THE ACTIVE SITE TOPOGRAPHY OF CELLOBIASE FROM *ASPERGILLUS TERREUS*

ЎBUACHIDZE T. Sh., CHIRGADZE L. T., NUTSUBIDZE N. N., KVESITADZE G. I.

Institute of Plant Biochemistry, Academy of Sciences of the Georgian SSR, Tbilisi

The mechanism of inhibition exerted by lactones of varying structure on the cellobiase-catalyzed hydrolysis of cellobiose has been studied. The kinetic parameters of this process were calculated, which allowed to put forward suggestions concerning some aspects of enzyme functioning and its active site topography. The lactones were demonstrated to be a promising tool in studies aimed at understanding the functioning of the cellulase enzyme complex, in particular cellobiase.