



УДК 577.152.321*4/135

ОКРАШЕННЫЙ СУБСТРАТ ЦЕЛЛЮЛОЗ. ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

*Рабинович М. Л., Савицкене Р. Ю. *, Герасимас В. В. *,
Мельник М. С., Новикова Т. В., Степановичюс Ю. Ю. *,
Денис Г. Й. *, Клесов А. А.*

Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва;

** Научно-производственное объединение «Фермент», Вильнюс*

Рассмотрены области применения окрашенных субстратов: растворимой СМ-целлюлозы и нерастворимой аморфной целлюлозы при изучении целлюлолитических ферментов. Показано, что растворимая СМ-целлюлоза является субстратом для избирательного определения эндоглюканаз целлюлазных комплексов различного происхождения. Окрашенная аморфная целлюлоза может расщепляться с образованием растворимых окрашенных продуктов как эндоглюканазами, так и целлюбеногидролазами, однако последние значительно менее активны. Эффективность целлюлазного комплекса при расщеплении окрашенной аморфной целлюлозы определяется не только активностью эндоглюканазы, но и ее сорбционной способностью. Таким образом, этот субстрат может служить для определения прочно сорбирующихся эндоглюканаз целлюлазных комплексов. Установлено также, что при добавлении окрашенной аморфной целлюлозы к комплексу фермента с неокрашенной целлюлозой происходит сдвиг адсорбционного равновесия и перенос фермента на окрашенный субстрат. Время полуперехода не зависит от концентрации субстратов, фермента и природы ферментного препарата и составляет 20–30 мин для кристаллической и 60–70 мин для аморфной целлюлозы. Путем кинетического анализа и прямых экспериментов с разделенными субстратами показано, что лимитирующей стадией переноса является десорбция фермента с поверхности нерастворимого субстрата в раствор. Показаны возможности применения обнаруженной обратимости сорбции для прямого определения активности адсорбированных целлюлаз, изучения структуры поверхности нерастворимого субстрата, поведения ферментов в адсорбционном слое.

Окрашенные субстраты нашли широкое применение для определения активности различных ферментов-деполимераз. Они значительно расширили границы области применения спектрофотометрии по сравнению с обычными хромогенными (например, нитрофениловыми) субстратами, которые, как правило, трудно получать в виде полимеров. Простота приготовления окрашенных субстратов делает их почти универсальными. Они могут быть как растворимыми [1], так и нерастворимыми [2, 3]. В последнем случае определение активности сравнительно просто автоматизировать и сделать регистрацию кинетики реакции непрерывной [3], что особенно важно при проведении прецизионных экспериментов.

Однако, хотя эти субстраты в относительно короткий срок завоевали признание, в большинстве случаев неясно, какие именно деполимеразы — эндо- или экзотипа — определяют с их помощью в комплексном препарате. Применяя окрашенную целлюлозу, предпочитают, например, говорить об определении «солюбилизирующей» активности целлюлазного комплекса в целом, а не какого-либо конкретного его компонента [2].

В данной статье будет рассмотрена природа действия целлюлазных комплексов различного происхождения, а также их отдельных компонентов на растворимые и нерастворимые окрашенные производные целлюлозы. Мы остановимся также на новых возможностях применения нерастворимого окрашенного субстрата: изучение кинетики и механизма переноса молекулы фермента между частицами целлюлозы, анализ структуры поверхности нерастворимых субстратов.

Окрашенная СМ-целлюлоза — субстрат для избирательного определения эндоглюканаз в целлюлазных комплексах. В работе [1] окрашенная СМ-целлюлоза была успешно применена для определения активности

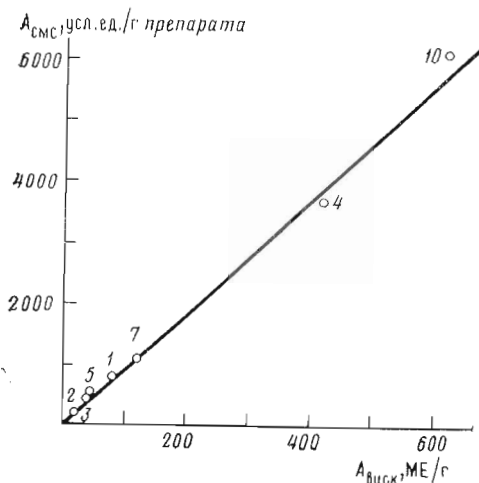


Рис. 1

Рис. 1. Корреляция между эндоглюканазной активностью целлюлазных препаратов, определенной вискозиметрическим методом ($A_{\text{виск}}$) и по окрашенной СМ-целлюлозе ($A_{\text{смс}}$). Нумерация препаратов — как в табл. 2

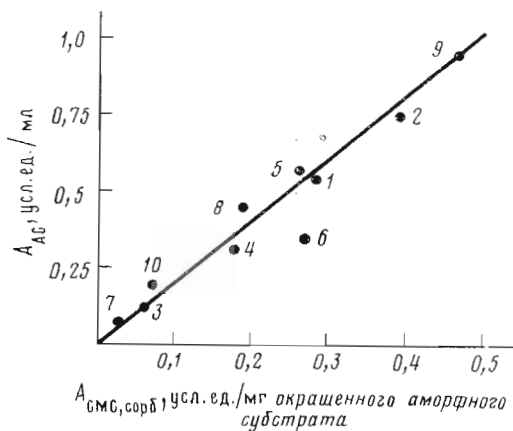


Рис. 2

Рис. 2. Корреляция между скоростью гидролиза окрашенной аморфной целлюлозы ($A_{\text{с}}$) и адсорбированной эндоглюканазной активностью, измеренной по окрашенной СМ-целлюлозе. Нумерация препаратов — как в табл. 2

высокоочищенной эндоглюканазы из целлюлазного препарата Driselase (Hakko Kogyo Co.). Однако возможность использования этого субстрата для избирательного определения эндоглюканаз в целлюлазных комплексах, где присутствуют и другие целлюлолитические ферменты, проверена не была.

Избирательным методом определения эндоглюканаз в целлюлазных препаратах является, как известно, вискозиметрический метод (см., например, [4]). Однако он неудобен при необходимости одновременного проведения большого числа анализов.

Нами была изучена возможность избирательного определения с помощью окрашенной целлюлозы эндоглюканаз в целлюлазных комплексах с различным соотношением компонентов. Были использованы технические препараты из *Aspergillus foetidus*, *Trichoderma viride*, *Geotrichum candidum*, *T. longibrachiatum* и очищенные препараты *Sporotrichum dimorphosporum* (Rapidase, Франция), *Aspergillus niger* (Serva, ФРГ) и *T. viride* (Boehringer Mannheim, ФРГ).

Строгая линейная корреляция между вискозиметрической активностью эндоглюканазы в препаратах, выраженной в международных единицах, и активностью по отношению к окрашенной СМ-целлюлозе в условных единицах (рис. 1) позволяет с помощью окрашенной СМ-целлюлозы в целлюлазных комплексах избирательно определять эндоглюканазный компонент. Этот метод удобнее и точнее в рутинном анализе, чем вискозиметрический [5]. Пропорциональность результатов обоих методов позволяет с помощью введения коэффициента пересчета оценивать по реакции с окрашенным субстратом и абсолютную активность эндоглюканаз:

$$A_{\text{виск}}(\text{МЕ}) = A_{\text{отн}} \cdot K \frac{D_2}{D_1},$$

где $A_{\text{отн}}$ — активность по окрашенному субстрату в условных единицах (в нашем случае $A_{\text{смс}}$), K — коэффициент пересчета, равный тангенсу угла наклона прямой на рис. 1, D_1 — поглощение при 490 нм 0,1% исходного раствора окрашенной СМ-целлюлозы, использованной для построения калибровочного графика, D_2 — поглощение такого же раствора окрашенной СМ-целлюлозы из другой партии. Отношение D_2/D_1 введено в формулу для того, чтобы изменение степени окраски СМ-целлюлозы не влияло па

Активность целлюлозногидролазных и эндоглюканазных фракций *T. reesei* по отношению к различным субстратам

Фермент	СМ-целлюлоза, вискозиметрия	Аморфная целлюлоза	Кристаллическая целлюлоза	Окрашенная аморфная целлюлоза, усл. ед./мг белка
	МЕ/мг белка			
Целлюбогидролаза I, pI 4,2	0,01	0,08	0,03	0,3
Целлюбогидролаза II, pI 5,9	0,008	0,8	0,03	2
Эндоглюкаказы, pI 4,7-5,3	20	Не определяли	0,05	14

Таблица 2

Сравнительная характеристика действия целлюлазных препаратов различного происхождения на окрашенные растворимый и нерастворимый субстраты

№	Источник	Изготовитель	Активность, усл. ед./мг препарата		A _{СМС} /A _{АС}	
			по окрашенной СМ-целлюлозе (A _{СМС})	по окрашенной аморфной целлюлозе (A _{АС})		
1	<i>T. longibrachiatum</i>	СССР, технические препараты	792	98	8,1	
2	<i>T. viride</i>		440	35	12,6	
3	<i>Asp. foetidus</i>		234	7,9	29,6	
4	<i>Sp. dimorphosporum</i>		Rapidase, Франция	3666	128	28,6
5	<i>Geotr. candidum</i>	СССР, технические препараты	550	24	22,9	
6	<i>T. koningii</i>		247	21	11,8	
7	<i>Asp. niger</i>		Serva, ФРГ	1080	14	77,1
8	<i>T. viride</i>		Onozuka K-10, Serva, ФРГ	10560	455	23,2
9	»	Очищенный аффинной хроматографией лабораторный препарат [8]	7480	577	13,0	
10	»	Boehringer Mannheim	6050	78	77,6	

результаты определения. При использовании одной и той же партии окрашенного субстрата это отношение равно 1.

Окрашенная аморфная целлюлоза — субстрат для определения сорбционной способности эндоглюканаз целлюлазных комплексов. По аналогии с окрашенной СМ-целлюлозой можно было полагать, что аморфная окрашенная целлюлоза также расщепляется в основном под действием эндоглюканазы. Это было проверено при изучении очищенных компонентов целлюлазного комплекса *T. reesei* (лабораторный продуцент, аналогичный отечественному *T. viride*): целлюбогидролазы I (pI 4,2), целлюбогидролазы II (pI 5,9), а также фракции (pI 4,7-5,3), включающей эндоглюканазы I (pI 4,7) и II (pI 5,3) [6, 7]. По данным аналитического изоэлектрофокусирования в геле, препараты целлюбогидролазы I и II были гомогенными, а препарат эндоглюкаказы содержал две полосы с pI 4,7 (основная) и 5,3 (минорная), соответствующие эндоглюканазам I и II *T. reesei* [7]. Препараты расщепляли аморфную и кристаллическую целлюлозу; целлюбогидролазные фракции давали главным образом целлюбозу, а эндоглюканазная — до 30% глюкозы. Результаты действия выделенных ферментных фракций на различные субстраты свидетельствуют (табл. 1), что удельная активность эндоглюканазной фракции по отношению к аморфной окрашенной целлюлозе в 7 раз выше, чем у целлюбогидролазы II, и в 45 раз выше, чем у целлюбогидролазы I. Таким образом, целлюбогидролазы способны в некоторой степени образовывать окрашенные продукты из аморфной окрашенной целлюлозы, и их действие на этот субстрат не

может быть приписано следовой эндоглюканазной активности, в 1000 раз меньшей, чем у эндоглюканазы. Однако основной вклад в образование окрашенных продуктов вносят, как и ожидалось, эндоглюканазы *T. reesei*.

Тем не менее, как видно из табл. 2, активности целлюлазных препаратов различного происхождения по отношению к окрашенной СМ-целлюлозе и окрашенной аморфной целлюлозе не коррелируют друг с другом и отношение активностей варьирует в пределах целого порядка. Следовательно, гидролиз окрашенной аморфной целлюлозы не определяется только содержанием эндоглюканазы в препарате.

Ранее [9] мы установили, что эндоглюканазы различных целлюлазных комплексов сильно отличаются по способности к адсорбции на целлюлозе. Поэтому было высказано предположение, что активность препарата по отношению к аморфной окрашенной целлюлозе зависит не только от содержания эндоглюканазы, но и от ее адсорбционной способности. Для проверки этого предположения была определена степень адсорбции различных эндоглюканаз на окрашенной целлюлозе.

Между количеством адсорбированной эндоглюканазы, выраженным в единицах активности по отношению к окрашенной СМ-целлюлозе, и активностью препарата по отношению к окрашенному нерастворимому субстрату существует отчетливая корреляция (рис. 2). Следовательно, этот субстрат может служить для характеристики способности эндоглюканаз целлюлазных комплексов к адсорбции на целлюлозном субстрате.

Итак, данные табл. 2 можно прокомментировать следующим образом: чем ниже отношение $A_{СМС}/A_{АС}$, тем более эффективно эндоглюканаза данного препарата сорбируется на целлюлозе. К наиболее эффективно сорбирующимся эндоглюканазам, таким образом, относятся ферменты препаратов *T. longibrachiatum*, *T. viride* (технический и очищенный нами препараты), *T. koningii*, к наименее эффективно сорбирующимся — *Sp. dimorphosporum*, *Asp. foetidus*, *Asp. niger* и *T. viride* (препарат Boehringer Mannheim). В той же последовательности препараты располагаются и по эффективности сорбции эндоглюканаз на микрокристаллической целлюлозе [9]. Более того, было установлено, что способность препарата гидролизовать микрокристаллическую целлюлозу строго коррелирует с эффективностью адсорбции эндоглюканазы [9]. Препараты *T. longibrachiatum*, *T. viride* (отечественный), *T. koningii* гидролизovali микрокристаллическую целлюлозу наиболее эффективно (за 70 ч почти полностью в присутствии избытка целлобиазы), тогда как препараты *Sp. dimorphosporum*, *Asp. foetidus*, *Asp. niger* и *T. viride* (Boehringer Mannheim) гидролизovali ее в этих же условиях на 10–20%. Сказанное позволяет считать, что отношение $A_{СМС}/A_{АС}$ для окрашенных субстратов может служить критерием способности целлюлазного комплекса к деградации высокоупорядоченной кристаллической целлюлозы: чем оно ниже, тем эффективнее комплекс будет расщеплять нерастворимые субстраты. Наиболее ярко применимость этого критерия демонстрируется при сравнении двух препаратов *T. viride* (№ 9 и 10). Этот микроорганизм традиционно считается примером продуцента высокоактивной по отношению к кристаллической целлюлозе ферментной системы. Однако препараты № 9 и 10 при близкой эндоглюканазной активности сильно различаются по отношению $A_{СМС}/A_{АС}$. И действительно, препарат № 10, содержащий слабо сорбирующиеся эндоглюканазы, почти не расщепляет кристаллическую целлюлозу, тогда как препарат № 9 делает это с высокой эффективностью [9].

Перенос адсорбированного фермента с неокрашенной целлюлозы на окрашенную: механизм и применение. Если к реакционной смеси, содержащей адсорбированные на обычной, неокрашенной целлюлозе ферменты, прибавить окрашенный субстрат, это вызовет сдвиг адсорбционного равновесия и частичный переход фермента с одного субстрата на другой. Благодаря тому что переход фермента на окрашенный субстрат легко обнаруживается по образованию растворимых окрашенных продуктов, мы имеем возможность изучать кинетику и механизм процессов адсорбции и десорбции целлюлаз в системе с нерастворимым субстратом. Впервые этот подход был применен нами в работах [10, 11].

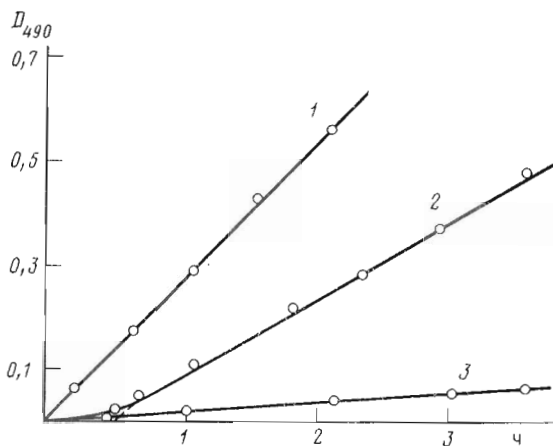


Рис. 3. Гидролиз окрашенной аморфной целлюлозы (S_2 ; 20 мг): 1 – ферментом (Meicelase, Япония; 0,2 МЕ), добавленным непосредственно к S_2 ; 2 – ферментом, предварительно адсорбированным на неокрашенной микрокристаллической целлюлозе авицел (S_1) (комплекс ES_1 получен смешиванием 0,2 МЕ фермента и 50 мг субстрата S_1 с последующим отмыванием неадсорбированного фермента, см. «Экспер. часть»); 3 – ферментом, находящимся в равновесии с комплексом ES_1 . Объем реакционной смеси 4 мл

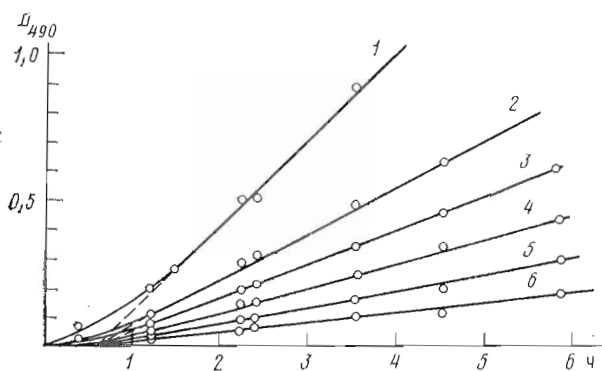
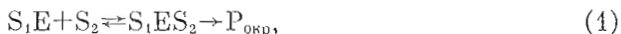


Рис. 4. Влияние концентраций субстратов S_1 и S_2 на кинетику переноса фермента из комплекса ES_1 , полученного смешиванием 0,2 МЕ фермента и 50 мг S_1 с последующим отмыванием неадсорбированного фермента. Добавлено мг S_2 : 40 (1), 20 (2), 15 (3), 10 (4); S_1 100 и S_2 20 мг (5), 200 и 20 мг соответственно (6). Условия и обозначения – см. рис. 3

При добавлении ферментного препарата непосредственно к окрашенному субстрату образование окрашенных продуктов имеет линейную зависимость от времени с самого начала реакции (рис. 3, 1). Однако если предварительно смешать то же количество фермента с неокрашенной микрокристаллической целлюлозой (авицел) и после удаления неадсорбированного фермента добавить к полученному комплексу фермента с неокрашенным субстратом окрашенную аморфную целлюлозу, то образование окраски наблюдается после определенного лаг-периода (рис. 3, 2).

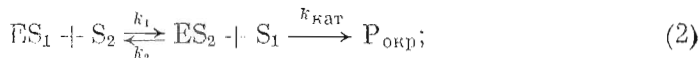
Можно предположить несколько вариантов действия адсорбированного на авицеле фермента на окрашенную целлюлозу:

1) фермент, связанный на поверхности неокрашенного субстрата не по активному центру, атакует окрашенный субстрат при контакте частиц обоих субстратов (действие по принципу иммобилизованного фермента):



где S_1 – неокрашенный, S_2 – окрашенный субстрат, $P_{\text{окр}}$ – окрашенный растворимый продукт;

2) фермент, связанный с неокрашенным субстратом, переносится на окрашенный в момент физического контакта частиц:



3) фермент, связанный с неокрашенным субстратом, переходит в раствор и затем адсорбируется на окрашенном субстрате (перенос через раствор):



4) окрашенный субстрат расщепляется только под действием фермента, находящегося в растворе в равновесии с адсорбированным ферментом; распад комплекса ES_1 при этом не происходит:



Данные рис. 3 позволяют исключить вариант 1, так как при его реализации трудно объяснить предстационарный участок кривой образования окраски при смешивании комплекса фермента с неокрашенным субстратом и окрашенного субстрата (кривая 2).

Скорость образования окраски растворенным ферментом, находящимся в равновесии с адсорбированным ферментом, крайне низка (рис. 3, 1) и намного уступает скорости реакции в присутствии адсорбированного на авицелле фермента (рис. 3, 2). Это позволяет исключить и вариант 4.

Рассматривая два оставшихся варианта, следует отметить, что для них обоих стационарная скорость образования окраски должна быть связана с концентрациями субстратов S_1 и S_2 идентичными выражениями. Рассчитывая концентрации перераспределившегося фермента и опуская не представляющие сложности промежуточные выкладки, для варианта 2 можем получить

$$\frac{d[P_{окр}]}{dt} = v = \frac{k_{кат}k_1[S_2][ES_1]_0}{k_1[S_2] + k_2[S_1]}, \quad (5)$$

а для варианта 3:

$$v = \frac{k_{кат}k_1k_2[S_2][ES_1]_0}{k_1k_{-2}[S_2] + k_2k_{-1}[S_1]}, \quad (6)$$

где $[ES_1]_0$ — исходная объемная концентрация адсорбированного на неокрашенной целлюлозе фермента.

Выражения (5) и (6) легко привести к общему виду

$$v = \frac{k_{кат}[ES_1]_0[S_2]/[S_1]}{[S_2]/[S_1] + K}, \quad (7)$$

аналогичному уравнению Михаэлиса — Ментен, где K — безразмерная величина, характеризующая в первом случае отношение k_2/k_1 , а во втором — k_2k_{-1}/k_1k_{-2} .

На рис. 4 изображена серия кривых для различных соотношений концентраций неокрашенного и окрашенного субстратов. Величина $[ES_1]_0$ во всех опытах была постоянна. Для этого сорбцию фермента всегда проводили на одном и том же количестве неокрашенного субстрата, а затем при необходимости варьирования концентрации неокрашенного субстрата S_1 его дополнительное количество вводили уже после промывки вместе с окрашенным субстратом S_2 (рис. 4, кривые 5, 6). Линеаризация стационарных скоростей реакции в двойных обратных координатах, аналогичных координатам Лайнуивера — Берка для уравнения (7), представлена на рис. 5. Здесь отрезок, отсекаемый на оси ординат, характеризует общее количество фермента в комплексе $[ES_1]_0$, которое могло бы перейти на окрашенный субстрат при бесконечном его избытке. Иначе говоря, эта величина является характеристикой сорбционной емкости исходного неокрашенного субстрата.

Отрезок на оси абсцисс характеризует величину K — отношение констант скоростей обмена фермента между окрашенным и неокрашенным

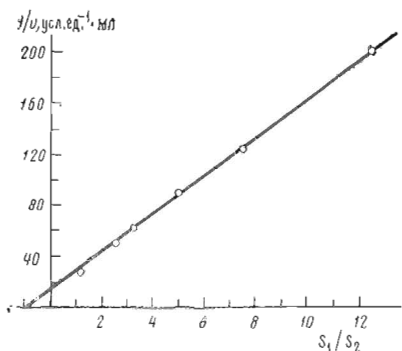


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость стационарных скоростей образования окраски от соотношения S_1/S_2 в координатах уравнения (7) (данные рис. 4)

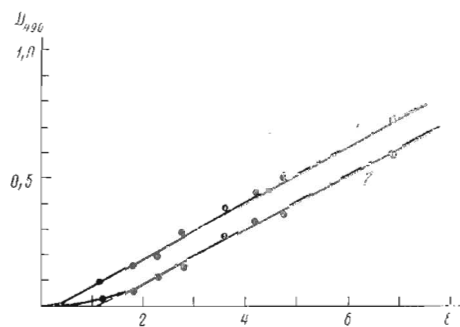


Рис. 6

Рис. 6. Гидролиз субстрата S_2 ферментом, адсорбированным на 50 мг S_1 (для сорбции взято 0,2 МЕ фермента) при контакте частиц S_1 и S_2 (1) и при разделении их мембраной (2). Условия и обозначения – см. рис. 3

субстратом. Это отношение, как видно из рис. 5, не сильно отличается от 1, т. е. константы скоростей обмена в прямом и обратном направлении близки.

Анализ стационарных скоростей образования окраски, как мы видим, не дает возможности выбрать между вариантами 2 и 3. В связи с этим проанализируем теоретически зависимость предстационарных участков (лаг-периодов) образования окраски от концентрации субстратов для обоих вариантов.

Для варианта 2 начальный участок кинетической кривой образования окрашенного продукта $P_{\text{окр}}$ описывается следующей системой дифференциальных и алгебраических уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{d[P_{\text{окр}}]}{dt} &= k_{\text{кат}} [ES_2], \\ \frac{d[ES_2]}{dt} &= k_1 [S_2] [ES_1] - k_2 [ES_2] [S_1], \\ [ES_2] + [ES_1] &= [ES_1]_0. \end{aligned}$$

Анализ этой простой системы дает, как известно, следующее выражение для лаг-периода, τ :

$$\tau = \frac{1}{k_1 [S_2] + k_2 [S_1]}. \quad (8)$$

Для случая 3 система уравнений более сложная:

$$\begin{aligned} \frac{d[P_{\text{окр}}]}{dt} &= k_{\text{кат}} [ES_2], \\ \frac{d[ES_2]}{dt} &= k_{-2} [S_2] [E] - k_2 [ES_2], \\ \frac{d[E]}{dt} &= k_1 [ES_1] + k_2 [ES_2] - (k_{-1} [S_1] + k_{-2} [S_1]) [E], \\ [ES_1] + [ES_2] + [E] &= [ES_1]_0. \end{aligned}$$

Для упрощения положим, что концентрация свободного фермента в системе стационарна и значительно меньше, чем концентрация $[ES_1]_0$. Справедливость этого допущения подтверждается рис. 3, показывающим, что активность фермента в растворе (кривая 3) составляет менее 10% от активности адсорбированного фермента (кривая 2). Система, соответствующая варианту (3), при этом приобретает более простой вид:

$$\frac{d[P_{\text{окр}}]}{dt} = k_{\text{кат}}[ES_2],$$

$$\frac{d[ES_2]}{dt} = k_{-2}[S_2][E] - k_2[ES_2],$$

$$[E] = \frac{k_1[ES_1] + k_2[ES_2]}{k_{-1}[S_1] + k_{-2}[S_2]},$$

$$[ES_1] = [ES_1]_0 - [ES_2]$$

или после подстановок и упрощений

$$\frac{d[P_{\text{окр}}]}{dt} = k_{\text{кат}}[ES_2],$$

$$\frac{d[ES_2]}{dt} = \frac{k_1 k_{-2}[S_2][ES_1]_0}{k_{-1}[S_1] + k_{-2}[S_2]} - \frac{k_1 k_{-2}[S_2] + k_2 k_{-1}[S_1]}{k_{-1}[S_1] + k_{-2}[S_2]} [ES_2].$$

В этом случае лаг-период τ имеет следующее выражение:

$$\tau = \frac{k_{-1}[S_1] + k_{-2}[S_2]}{k_1 k_{-2}[S_2] + k_2 k_{-1}[S_1]}. \quad (9)$$

Выражение (8) показывает, что при переносе фермента между частицами S_1 и S_2 в момент их прямого контакта лаг-период образования окраски должен уменьшаться с ростом концентраций S_1 и S_2 , иначе говоря, при увеличении частоты соударений. Напротив, анализ выражения (9) показывает, что при сравнимых значениях k_1 и k_2 , k_{-1} и k_{-2} * лаг-период не должен существенно изменяться с изменением концентраций частиц. Иначе говоря, при лимитирующей стадии десорбции фермента с поверхности субстрата в раствор (а именно это и означает допущение о том, что $[E] \ll [ES_1]_0$) лаг-период не должен зависеть от концентрации субстратов S_1 и S_2 .

Это действительно так (рис. 4). Лаг-период остается в пределах 25–35 мин при широком варьировании концентраций субстратов S_1 и S_2 . Более того, он почти не зависит и от концентраций фермента и природы ферментного препарата (см. ниже рис. 7 и 8). На этом основании мы пришли к выводу, что, как и следует из анализа предстационарного участка кинетических кривых, перенос фермента между частицами субстрата происходит через раствор, а лимитирующей стадией, определяющей величину лаг-периода (обычно 25–35 мин для микрокристаллической целлюлозы), является десорбция прочно адсорбированной эндоглюказа с поверхности субстрата в раствор.

Для непосредственного подтверждения наличия переноса фермента между частицами субстрата без их прямого контакта нами было использовано специальное устройство. Оно представляло собой установленный на магнитную мешалку центрифужный стакан, внутри которого была колонка с мембраной-фильтром, используемая при препаративном flat-bed-электрофокусировании для электрофореза ферментов из геля (ЛКВ, комплект Multiphor). На мембрану помещалась еще одна, круглая магнитная мешалка. Фермент, адсорбированный на неокрашенном субстрате, находился в центрифужном стакане, а в колонку с фильтром добавлялся окрашенный субстрат, содержащийся в том же растворе, но отделенный от адсорбированного фермента мембраной. Обе части суспензии (окрашенная и неокрашенная) перемешивались своими мешалками.

На рис. 5 показана кинетика образования окраски в такой системе (контакт частиц S_1 и S_2 практически исключен), а также при смешивании S_1 и S_2 в одном стакане, без разделяющей мембраны. Стационарные скорости в обоих случаях практически одинаковы, т. е. количество переносимого фермента при отсутствии контакта между частицами такое же, как и при прямом контакте. Таким образом, перенос фермента через раствор

* О том, что величины констант сравнимы, свидетельствует близость к 1 их отношения K (рис. 5 и пояснения к нему).

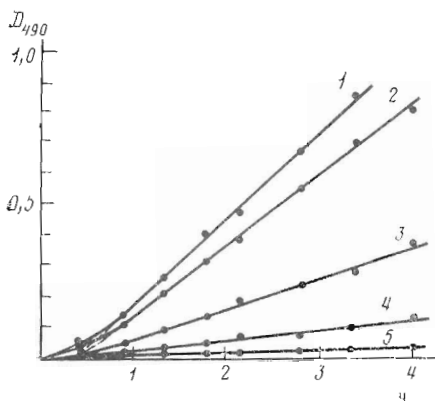


Рис. 7

Рис. 7. Гидролиз субстрата S_2 различными ферментными препаратами, предварительно адсорбированными на 50 мг S_1 (для сорбции взято 0,4 МЕ фермента). 1 — *T. viride* (Meicelase), 2 — *G. candidum* (очищенный), 3 — *T. viride* (Onozuka), 4 — *Sp. dimorphosporum* (Rapidase), 5 — *Asp. niger* (Serva). Условия и обозначения — см. рис. 3

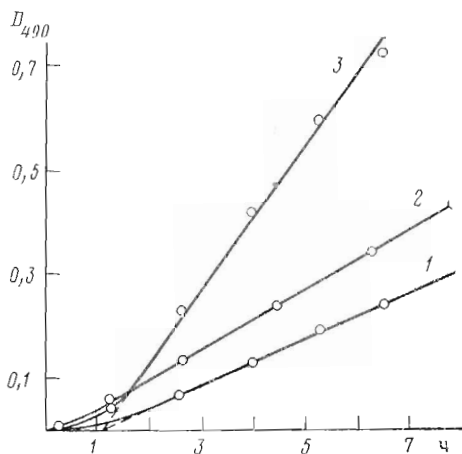


Рис. 8

Рис. 8. Влияние надмолекулярной структуры нерастворимого субстрата S_1 на устойчивость фермент-субстратного комплекса ES_1 . 1 — гидролиз субстрата S_2 ферментом, адсорбированным на 50 мг аморфного S_1 (для адсорбции взято 0,1 МЕ фермента); 2 — то же, но фермент предварительно адсорбирован на 50 мг кристаллического S_1 ; 3 — то же, что в опыте 1, но E_0 — 0,4 МЕ. Условия и обозначения см. в подписи к рис. 3

действительно имеет место. Однако лаг-период в случае разделенных субстратов почти втрое больше, чем для смешиваемых. Чем это объясняется: лимитирующим характером диффузии фермента в разделяющей мембране, или тем, что контакт частиц все же играет какую-то роль в переносе адсорбированного фермента, пока неясно.

Определение активности адсорбированных эндоглюканаз. Использование метода переноса адсорбированного фермента на окрашенный субстрат дает прямой способ определения активности адсорбированных ферментов. На рис. 7 приведены результаты определения активности адсорбированных на микрокристаллической целлюлозе эндоглюканаз различных целлюлазных препаратов с помощью окрашенного аморфного субстрата. Исходные активности эндоглюканаз были одинаковы во всех случаях. После сорбции ферментов на авицеле супернатант с неадсорбированной частью ферментов удаляли центрифугированием, целлюлозу промывали и добавляли окрашенный субстрат. Естественно, там, где на авицеле сорбировалось больше эндоглюканазы, должно было наблюдаться и более эффективное ее действие на окрашенный субстрат.

Максимальное количество эндоглюканазы, прочно связывающейся с авицелом и не удаляемой при промывке, содержит препарат *T. viride* (Meicelase), меньше — *G. candidum*, еще меньше — *T. viride* (Onozuka) (рис. 7). Препарат *Sp. dimorphosporum* (Rapidase) содержит лишь незначительное количество прочно связывающейся эндоглюканазы, а препарат *Asp. niger* не содержит ее совсем. Это означает, что эндоглюканазы двух последних препаратов являются слабо сорбирующимися.

Эти данные хорошо согласуются с данными табл. 2 и рис. 2. Используемая здесь процедура прямого определения активности прочно связывающихся эндоглюканаз дает ту же последовательность препаратов, что и метод, основанный на косвенном определении количества адсорбированного фермента по убыли активности в растворе. Разумеется, прямой метод определения активности более достоверен, так как убыль активности в растворе может быть вызвана не только адсорбцией, но и инактивацией.

Изучение структуры поверхности целлюлозы и ее влияния на фермент-субстратные взаимодействия. Применение техники переноса адсорбирован-

ного фермента с неокрашенного субстрата на окрашенный позволяет сделать весьма любопытные выводы и о структуре поверхности целлюлозы. Как отмечалось выше, для прочно адсорбированных эндоглюканаз различного происхождения время полупереноса с кристаллической целлюлозы на окрашенный аморфный субстрат (лаг-период образования окраски) составляет $\sim 25-35$ мин и не зависит от концентраций S_1 и S_2 (рис. 4, 7).

На рис. 8 показана кинетика образования окраски при переносе адсорбированного фермента с аморфного субстрата (целлюлоза, регенерированная из H_3PO_4) при двух различных концентрациях $[E]_0$ (кривые 1, 3) и кристаллической целлюлозы (кривая 2). Лаг-период в случае аморфной целлюлозы значительно (в 2-3 раза) больше ($60-75$ мин) и не зависит от используемой концентрации фермента.

Эти данные позволяют сделать несколько выводов. Во-первых, время полуперехода фермента с одной частицы субстрата на другую не связано с полным гидролизом частицы. Иначе для аморфного субстрата это время было бы меньше, чем для кристаллического, и уменьшалось с увеличением концентрации фермента. Таким образом, обмен фермента между частицами целлюлозы происходит много быстрее их полного гидролиза. Во-вторых, «шероховатая» поверхность аморфной целлюлозы удерживает фермент дольше, чем «гладкая» поверхность кристаллического субстрата (вероятно, вследствие большей степени «комплементарности» глобулы фермента и поверхности). Это позволяет использовать величину лаг-периода как характеристику степеней «аморфности» поверхности субстрата. В-третьих, фермент остается в связанном с частицей субстрата состоянии в течение $25-75$ мин (в зависимости от состояния ее поверхности). Даже если число оборотов фермента в каталитическом превращении на поверхности составляет $0,1 \text{ с}^{-1}$ (произвольно выбранная, но достаточно низкая активность), то и в этом случае он осуществляет сотни каталитических актов, не покидая поверхности субстрата. Это приводит к заключению о наличии подвижности (поверхностной диффузии) фермента в адсорбционном слое субстрата.

Экспериментальная часть

Окрашенная СМ-целлюлоза (растворимый окрашенный субстрат). В 1 л дистиллированной воды в круглодонной 3-л колбе растворяли при нагревании до $50-60^\circ \text{C}$ и перемешивании 20 г СМ-целлюлозы отечественного производства (степень замещения 0,7, степень полимеризации 450), добавляли 1 л 4% раствора активного винилсульфонового красителя нафталинового ряда ярко-оранжевого ЖТ. Затем при перемешивании в течение 45 мин вносили 140 г Na_2SO_4 , подщелачивали 10% $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ (0,2 л), перемешивали 60 мин, охлаждали, концентрировали ультрафильтрацией на колонке с полыми волокнами УПА-50 до 1 л, добавляя дистиллированную воду, пока поглощение фильтра при 490 нм не снизилось до 0,8. К концентрату добавляли 1,5 л 96% этанола с 0,01 М КСl, осадок центрифугировали при 2500 об/мин (10-15 мин) и промывали 2 раза 96%, один раз 75% этанолом, один раз эфиром (по 0,5 л), сушили в вакуумном эксикаторе и измельчали на шаровой мельнице. Выход окрашенной СМ-целлюлозы - 70-90% (14-18 г), содержание красителя (по поглощению при 490 нм) - 1 на 40-50 г глюкозных остатков.

Окрашенная аморфная целлюлоза (нерастворимый окрашенный субстрат, S_2). 20 г порошковой целлюлозы отечественного производства растворяли при перемешивании в 400 мл 83% H_3PO_4 в течение 3-4 ч, осаждали водой (1 л), промывали 2 раза водой (по 1 л), нейтрализовали 10% Na_2CO_3 (300 мл) до рН 8, снова 2 раза промывали водой (по 1 л), лиофилизировали и получали 15 г аморфной целлюлозы. К 50 г такой целлюлозы в 500 мл воды в 2-л колбе при 50°C добавляли 500 мл 0,5% раствора ярко-оранжевого красителя, 100 г Na_2SO_4 , перемешивали 45 мин, подщелачивали 10% $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ (150 мл), центрифугировали при 3000 об/мин, промывали 5 раз теплой водой (по 1 л), 2 раза ацетоном (по 500 мл) и 1 раз эфиром (500 мл). Высушивали на воздухе и измельчали растира-

нием. Выход окрашенного субстрата 75–80% (35–40 г). Содержание красителя по поглощению 0,1% раствора субстрата в H_3PO_4 при 505 нм (максимум поглощения красителя в H_3PO_4) — 1 на 140–150 глюкозных остатков.

Использовали производимые в СССР технические ферментные препараты из *Trichoderma viride* (целлюридин ГЗх), *T. longibrachiatum* (целлобранин Г10х), *T. koningii* (целлокониинги П10х), *Geotrichum candidum* (целлокандин ГЗх), *Aspergillus foetidus* (пектофоетин ГЗх); очищенные с помощью аффинной хроматографии [8] целлюлазные комплексы *T. viride* и *G. candidum*, а также коммерческие целлюлазные препараты: *Asp. niger* (Serva, ФРГ), *T. viride* (Onozuka P-10, Serva, ФРГ), *T. viride* (Bocchringer Mannheim, ФРГ), *Sporotrichum dimorphosporum* (Rapidase, Франция), *T. viride* (Meicelase, Meiji Seika, Япония). Очищенные компоненты целлюлазного комплекса *T. reesei* получали как описано в работе [6]: эндоглюканазную фракцию (pI 4,7–5,3) — с помощью аффинной хроматографии культуральной жидкости продуцента на измельченном хлопковом линте и высокоэффективной ионообменной хроматографии на жестком носителе DEAE-сфероне 1000 [6]. Для получения очищенной целлобиогидролазы I (pI 4,2) фракцию белков (pI 3,8–4,2) после ионообменной хроматографии подвергали препаративному изоэлектрофокусированию в слое ультодекса (градиент амфолинов 2,5–5,0) на приборе LKB 2117 Multiphor при стартовом напряжении 200 В и токе 19,5 мА в течение 16 ч (конечное напряжение 700 В, ток 10,6 мА). Очищенную целлобиогидролазу II (pH 5,9) получали с помощью аналогичного изоэлектрофокусирования фракции белков с pI 4,8–6,5 после ионообменной хроматографии в градиенте амфолинов 4–6,5 при стартовом напряжении 570 В, токе 14 мА (конечное напряжение 1165 В, ток 6,75 мА). Аналитическое изоэлектрофокусирование для характеристики чистоты полученных ферментов проводили на том же приборе в пластинках полгакриламидного геля (LKB 1804-101) в градиенте амфолинов 3,5–9,5 при начальном напряжении 1500 В и токе 50 мА в течение 2 ч.

Эндоглюканазную активность целлюлазных препаратов определяли с помощью вискозиметрического метода [4] и выражали в международных единицах (МЕ, мкмоль гликозидных связей, расщепляемых в 1 мин).

Активность ферментов по отношению к неокрашенным субстратам, аморфизованной целлюлозе и авицелле, определяли при 40° С, pH 4,5, концентрации субстрата 5 г/л с перемешиванием на магнитной мешалке в течение 1 ч. Реакционную смесь центрифугировали и в супернатанте определяли глюкозу глюкозооксидазно-пероксидазным методом [12] и восстанавливающие сахара — методом Шомоди — Нельсона.

Определение активности целлюлаз по отношению к растворимому окрашенному субстрату. 5 мл 1% раствора окрашенной СМ-целлюлозы в 0,1 М ацетатном буфере, pH 4,5, при 40° С смешивали с 1 мл раствора ферментного препарата в том же буфере (0,005–0,05 МЕ/мл), инкубировали 10 мин, добавляли 5 мл 80% этанола, содержащего 25 мМ $CaCl_2$, взбалтывали, фильтровали через бумажный фильтр и определяли поглощение при 490 нм. Для приготовления контроля в пробирку с 5 мл раствора субстрата добавляли сразу 5 мл осадителя, затем 1 мл раствора фермента и полученную смесь фильтровали. 1 усл. ед. акт. A_{500} равна 0,05 OE_{490} в 1 мин (при осаждении реакционная среда разбавляется в ~2 раза).

Определение активности по отношению к окрашенному нерастворимому субстрату. К 150 мг субстрата в 5 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 4,5, в конических колбах на 50 мл при 40° С на качалке (100 кол/мин) добавляли 2 мл раствора фермента (активность 0,1–1 МЕ/мл по эндоглюканазе), инкубировали 20 мин, фильтровали и определяли поглощение при 490 нм. Для приготовления контроля к суспензии субстрата быстро добавляли раствор фермента и сразу фильтровали. Здесь и далее 1 усл. ед. акт. A_{500} равна 0,1 OE_{490} в 1 мин.

Изучение взаимосвязи между способностью эндоглюканаз к адсорбции на окрашенной целлюлозе и их активностью по отношению к этому суб-

страту. С помощью окрашенной СМ-целлюлозы определяли активность эндоглюканазы $A_{СМС}$ до сорбции, затем проводили сорбцию на окрашенном субстрате в течение 5 мин; из супернатанта отбирали пробу и снова определяли в ней эндоглюканазу с окрашенной СМ-целлюлозой. По разности этих определений рассчитывали количество адсорбированной эндоглюканазы:

$$A_{сорб} = (A_{исх} - A_{несорб}) / [S_2].$$

Для определения активности препарата по отношению к аморфной целлюлозе (A_{AC}) использовали ту же реакционную смесь, что и для адсорбции.

При определении активности очищенных эндоглюканаз и целлобиогидролаз *T. reesei* 50 мг окрашенного нерастворимого субстрата суспендировали в 4 мл 0,1 М ацетатного буфера, рН 4,5, в центрифужных пробирках емкостью 10 мл при перемешивании на магнитной мешалке, добавляли 30–100 мкл (0,02–1,2 мг) фермента и регистрировали кинетику увеличения окраски супернатанта при 490 нм (20° С), периодически центрифугируя реакционную смесь при 3000 об/мин в течение 1 мин.

Кинетика переноса целлюлаз между частицами целлюлозы с помощью нерастворимого окрашенного субстрата. Навеску (10–100 мг) неокрашенной целлюлозы (микрористаллическая целлюлоза авицел, Serva, или целлюлоза, регенерированная из H_2PO_4) суспендировали в 10 мл 0,1 М ацетатного буфера, рН 4,5, в центрифужных пробирках на магнитной мешалке при 20° С, добавляли 0,1–0,4 мл раствора фермента (0,1–0,4 МЕ), перемешивали в течение 5 мин для установления адсорбционного равновесия, отделяли супернатант с неадсорбированными ферментами центрифугированием, а осадок дважды промывали 10 мл буфера. К промытому осадку добавляли 4 мл буфера и навеску окрашенного нерастворимого субстрата (10–50 мг), перемешивали при 20° С и регистрировали поглощение супернатанта при 490 нм, периодически центрифугируя реакционную смесь при 3000 об/мин в течение 1 мин. Начало регистрации кинетики образования окрашенных продуктов соответствовало добавлению в систему окрашенного нерастворимого субстрата.

ЛИТЕРАТУРА

1. McCleary B. V. Carbohydr. Res., 1980, v. 86, № 1, p. 97–104.
2. Leisola M., Linko M. Anal. Biochem., 1976, v. 70, № 2, p. 592–600.
3. Ng T. K., Zeikus K. G. Anal. Biochem., 1980, v. 103, № 1, p. 42–50.
4. Рабинович М. Л., Клесов А. А., Березин И. В. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 3, с. 405–414.
5. А. с. 1142058 (СССР). Способ определения эндоглюканазной активности / Савицкене Р. Ю., Герасимас В. Б., Рабинович М. Л., Клесов А. А., Степановичус Ю. Ю., Денис Г. И. Заявл. 31.03.83, № 3598702/28–13 – Оpubл. в Б. И., 1984, № 33.
6. Новикова Т. В. В кн.: Тезисы докладов VI республиканской конференции молодых ученых-химиков, Таллин, 1985, с. 151.
7. Shoemaker S. P., Watt K., Tsitovsky G., Cox R. Bio/Technology 1983, v. 1, № 8, p. 687–690.
8. Мартынов В. А., Рабинович М. Л., Клесов А. А., Мягких И. В., Гернет М. В. Прикл. биохим. микробиол., 1983, т. 19, вып. 4, с. 513–520.
9. Рабинович М. Л., Клесов А. А., Черноглазов В. М., Нгуен Ван Вьет, Березин И. В. Докл. АН СССР, 1981, т. 260, № 6, с. 1481–1486.
10. Рабинович М. Л., Клесов А. А., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1984, т. 274, № 3, с. 758–763.
11. Рабинович М. Л. В кн.: Тезисы докладов 16-й Конференции ФЭБО. М., 1984, с. 393.
12. Березин И. В., Рабинович М. Л., Сеницын А. П. Биохимия, 1977, т. 42, вып. 9, с. 1631–1636.

Поступила в редакцию
15.III.1985

A DYED SUBSTRATE OF CELLULASES: FIELDS OF APPLICATION

RABINOVICH M. L., SAVITSKENE R. Yu., GERASIMAS V. B.*,
MEL'NICK M. S., NOVIKOVA T. V., STEPONAVICHUS Yu. Yu. *,
DENIS G. Y. *, KLYOSOV A. A.

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
**NPO «Ferment», Vilnius*

The application of dyed substrates, soluble dyed CM-cellulose and insoluble amorphous cellulose, for determination of cellulases has been studied. Dyed soluble CM-cellulose was shown to be a substrate for selective endoglucanase determination in the cellulase complexes of different origin. Dyed amorphous cellulose was degraded by either endoglucanases or cellobiohydrolases from *T. reesei*, but endoglucanases were far more active. Activity of cellulase preparations correlated with the amount of endoglucanase adsorbed on the dyed amorphous substrate. A new kinetic method was developed for the investigation of the adsorbed endoglucanase transfer from one insoluble substrate (nondyed) to another (dyed) one. Such an approach allowed the direct determination of the amount of adsorbed enzyme, the desorption rate of endoglucanase molecule from the cellulose surface, as well as characterization of the state of substrate surface.