



УДК 577.152.321*91'1

СПЕЦИФИЧНОСТЬ СОРБЦИИ ЦЕЛЛОБИОГИДРОЛАЗЫ I
TRICHODERMA REESEI НА ПРОИЗВОДНЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗЫРабинович М. Л., Новикова Т. В., Клесов А. А.,
Березин И. В.

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

С помощью нового метода разделения, сочетающего аффинное связывание на целлюлозе и последующее аналитическое изоэлектрофокусирование белков, прочно адсорбированных на аффинном носителе, проанализирован состав ферментов целлюлозного комплекса *Trichoderma reesei* с высоким средством к целлюлозе. Основными компонентами, связывающимися на микрокристаллической целлюлозе, являются целлобиогидролаза I (pI 4,2) и два-три ее изофермента с pI 3,8–4,0, а также эндо-глюканаза I (pI 4,7) и ее изоформы (pI 4,3–4,8). На целлофане и вискозе доминировала сорбция основной формы целлобиогидролазы I (pI 4,2). На основании полученных данных предложен метод специфической детекции целлобиогидролазы I в неочищенных препаратах новых продуцентов.

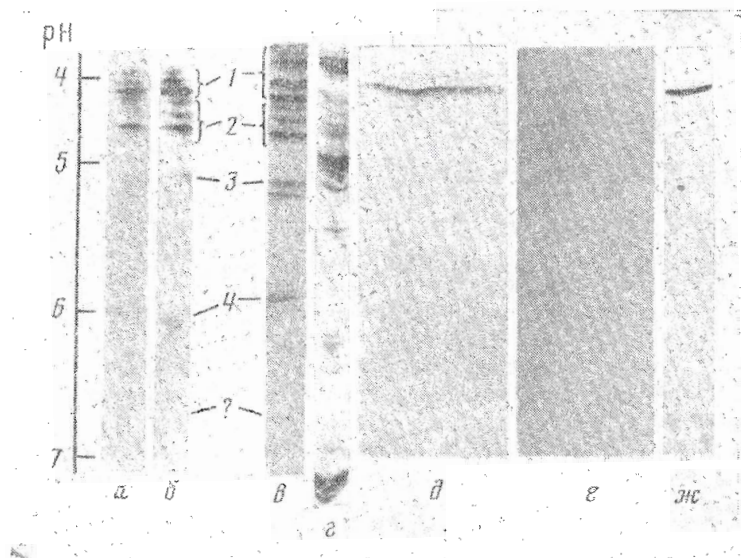
Целлобиогидролаза (КФ 3.2.1.91) является основным ферментом целлюлазного комплекса, играющим ключевую роль в деградации целлюлозо-содержащих материалов до глюкозы [1–3]. В последние годы интерес к ней особенно возрос в связи с попытками клонирования генов этого фермента в дрожжах [4–6]. Однако свойства целлобиогидролазы в настоящее время мало изучены в связи с недостаточной разработанностью методов их избирательного определения в целлюлазном комплексе. Единственный специфический тест — иммунофорез [7] — требует предварительного получения антител к высокоочищенному ферменту и неприемлем при выделении целлобиогидролазы из новых, неизученных источников.

В настоящем сообщении обнаружено свойство целлобиогидролазы I *Trichoderma reesei* специфически сорбироваться на производных целлюлозы и изложен общий принцип ее выявления в неочищенных целлюлазных препаратах, основанный на этом свойстве.

Нами был разработан новый метод избирательной детекции целлюлолитических ферментов, применимый в принципе также для других белков и основанный на сочетании специфической сорбции белка на аффинном сорбенте и аналитического изоэлектрофокусирования полученного нерастворимого комплекса в пластинах полиакриламидного геля. При нанесении аффинного сорбента со связанным белком на поверхность пластины геля и наложении на нее напряжения происходит электродсорбция белка и его диффузия внутрь геля, где он фокусируется в соответствии со значением pI. Другие белки неочищенного препарата отделяются на стадии специфической сорбции и не проявляются при фокусировании.

На рисунке показана типичная изоэлектрофограмма белков, адсорбированных из культуральной жидкости *T. reesei* на микрокристаллической целлюлозе (а). После сорбции целлюлозу промывали 0,1 М фосфатным буфером для удаления неспецифически сорбирующихся примесей [8, 9], а затем водой для обессоливания. На пластине четко проявляются от 6 до 8 кислых белков с изоточками в области 3,8–4,8. Если стадию сорбции с последующей промывкой фосфатом проводить не один, а три раза, каждый раз со свежей порцией культуральной жидкости, то все полосы, в особенности минорные, становятся более четкими (рисунок, б). Кроме того, проявляются дополнительные компоненты с pI в области 5,3; 5,9 и 6,5. Наиболее интенсивные полосы дают белки с изоточками 4,2; 4,7; 4,0.

Идентификация белков, специфически сорбирующихся на целлюлозе,



Результаты аналитического изоэлектрофокусирования целлюлолитических ферментов *T. reesei* в пластинках полиакриламидного геля в диапазоне pH 3,5–9,5: а – белки, адсорбированные на микрокристаллической целлюлозе из культуральной жидкости (однократная сорбция); б – то же, трехкратная сорбция; в – очищенный препарат целлюлолитических ферментов *T. reesei*, полученный путем аффинной хроматографии на целлюлозе и практически не содержащий сопутствующих целлюлазам ферментов *T. reesei* [9]; г – белки культуральной жидкости *T. reesei*, не сорбирующиеся на целлюлозе; д – белки, адсорбированные на целлофане; е – то же, на вискозе; жс – выделенный из очищенного аффинной хроматографией препарата основной изофермент целлюбиогидролазы I *T. reesei* (pI 4,2). 1 – изоферменты целлюбиогидролазы I (pI 3,8–4,2), 2 – изоферменты эндоглюканазы I (pI 4,3–4,8), 3 – целлюлазы невыясненной природы (эндоглюканаза II или целлюбиогидролаза, pI 5,3–5,4), 4 – целлюбиогидролаза II (pI 5,9), 5 – белок невыясненной природы

была проведена путем сравнения их изоэлектрофореграмм (а, б) с изоэлектрофореграммой очищенного целлюлазного препарата *T. reesei* (в), полученного аффинной хроматографией на целлюлозном сорбенте [8, 9]. Рисунок показывает сходство изоэлектрофореграмм б и в по всем основным компонентам.

Ранее [9] нами было проведено фракционирование препарата *T. reesei* после аффинной хроматографии. На основании полученных, а также литературных данных [4, 10] был сделан вывод, что основной белок *T. reesei* с pI 4,2 – целлюбиогидролаза I, а белки с pI 3,8–4,0 – ее минорные формы. Белок с pI 4,7 – эндоглюканаза I, а белки с pI 4,3–4,8 – множественные формы эндоглюканазы. Белки с pI 5,9–6 относятся к целлюбиогидролазе II. Белки с pI 5,3–5,4 пока не выделены в чистом виде. По данным работы [4] они относятся к эндоглюканазе II, однако по нашим предварительным данным они имеют высокую эндоглюканазную активность, но активно образуют целлюбиозу из аморфной целлюлозы и в этом отношении напоминают целлюбиогидролазу II. Минорный белок с pI 6,5 содержится в аффинном препарате в очень малых количествах и не идентифицирован.

Приложение полученных результатов к рисунку а, б показывает, что наиболее эффективно на микрокристаллической целлюлозе из культуральной жидкости *T. reesei* сорбируется целлюбиогидролаза I (pI 4,2) и ее минорная форма с pI 4,0, а также эндоглюканаза I (pI 4,7). Целлюбиогидролаза II (5,9–6) и целлюлазный компонент с pI 5,3–5,4 сорбируются менее эффективно и могут быть надежно идентифицированы лишь при многократной сорбции.

Для сравнения на рисунке г приведена изоэлектрофореграмма белков культуральной жидкости *T. reesei*, не способных сорбироваться на целлюлозе. Характер ее совершенно иной. Это подтверждает, что сорбция целлюлаза на целлюлозе специфична.

Микрокристаллическая целлюлоза является групповым сорбентом для ферментов целлюлазного комплекса и связывает не только целлюбогидролазы, но и эндогликоказы (рисунок *a, б*). Более специфическими сорбентами целлюбогидролазы I, причем только основной ее формы с *pI* 4,2, оказались целлофановая пленка и вязкозная ткань (рисунок *д, е*).

Применение образующих пленки производных целлюлозы, а также ткапей на целлюлозной основе в качестве специфических сорбентов целлюлаз представляется весьма заманчивым. Отделение сорбента со связанными ферментами от культуральной жидкости, его промывка, наконец, нанесение на поверхность пластины геля при этом предельно упрощаются. То, что эти производные имеют малую поверхность для сорбции, не является препятствием благодаря возможности последовательного накапливания ферментов в слое геля с последующим их фокусированием.

Рисунок *д* показывает, что при нанесении адсорбированных на целлофане ферментов в несколько этапов и во всю ширину пластины качество изоэлектрофограммы достаточно высокое. Хорошо видно, что при используемой процедуре происходит избирательное накопление в слое геля основной формы целлюбогидролазы I (*pI* 4,2). Минорные формы целлюбогидролазы I значительно менее заметны, а эндогликоказные компоненты почти не проявляются.

Аналогичную специфичность сорбции проявляет и вязкозная ткань (рисунок *е*), однако в этом случае качество изоэлектрофограммы несколько ниже, чем с целлофаном.

Для сравнения на рисунке *ж* приведены результаты аналитического изоэлектрофокусирования основной формы целлюбогидролазы I *T. reesei*, выделенной из препарата, очищенного аффинной хроматографией, с помощью комбинации ионообменной хроматографии на жестком носителе DEAE-сфереоне и ирреративного изоэлектрофокусирования в слое ультрадекса. Сопоставление рисунка *a—ж* показывает, что простая процедура сорбции — фокусирования весьма эффективна при отделении основной формы целлюбогидролазы I от сопутствующих белков и родственных ферментов.

Мы полагаем, что целлюбогидролаза I — наиболее прочно сорбирующийся на целлюлозе белок целлюлазного комплекса *T. reesei*. Она является также доминирующим внеклеточным ферментом в среде выращивания этого гриба [10]. Поэтому при использовании сорбентов с малой адсорбционной емкостью (целлофан, вискоза) она, вероятно, может вытеснять все другие целлюлолитические ферменты с поверхности целлюлозы.

Следует подчеркнуть, что ферменты, аналогичные целлюбогидролазе I *T. reesei*, — необходимый компонент целлюлазных комплексов, осуществляющих деградацию высокоупорядоченной целлюлозы [11]. Как было показано нами ранее, целлюлолитические ферменты этих комплексов, в том числе *T. viride*, *T. longibrachiatum*, *Geotrichum candidum*, обладают способностью к эффективной адсорбции на целлюлозе в отличие от целлюлаз других грибов (*Aspergillus niger*, *Asp. foetidus*, *Sporotrichum dimorphosporum*), плохо расщепляющих кристаллическую целлюлозу и не сорбирующихся на ней [12]. Поэтому есть основания предполагать, что целлюбогидролазы из различных целлюлазных комплексов, расщепляющих упорядоченную целлюлозу, наиболее прочно сорбируются на целлюлозе безками.

Итак, в данной работе обнаружено свойство целлюбогидролазы I избирательно сорбироваться из грубого экстракта, содержащего другие целлюлолитические ферменты и швертные белки, на производных целлюлозы. Это свойство применено для селективного обнаружения целлюбогидролазы I с помощью нового метода, включающего аффинную сорбцию белка с последующей его электродесорбцией и изофокусированием в слое геля. Описанный подход может найти применение в идентификации целлюбогидролазы I различного происхождения, в том числе и из термофильных источников, а также рекомбинантных штаммов.

Экспериментальная часть

В качестве источника целлюлаз использована культуральная жидкость мутантного штамма *T. reesei*. Использован также очищенный целлюлазный комплекс *T. reesei*, полученный путем аффинной хроматографии культуральной жидкости на целлюлозном сорбенте [8]. Основная форма целлоблогидролазы I *T. reesei* получена путем ионообменной хроматографии очищенного аффинной хроматографией целлюлазного комплекса *T. reesei* на DEAE-сфереоне А-50 [9], обессоливания и препаративного изоэлектрофокусирования в ультрадексе (градиент амфолинов 3–5) на приборе Multiphor 2117 LKB в течение 16 ч согласно инструкции фирмы-изготовителя.

Аналитическое изоэлектрофокусирование в пластинках полиакриламидного геля (LKB 1804-101) проводили в течение 2 ч на том же приборе в градиенте амфолинов 3,5–9,5 (напряжение 1500 В, ток 50 мА).

Фиксацию белковых зон с помощью трихлоруксусной кислоты, их окрашивание красителем кумасси G и последующее отмывание пластины осуществляли в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя (LKB).

В качестве специфических сорбентов использовали микрокристаллическую целлюлозу (Сметарол, ЧССР) для колоночной хроматографии, целлофановую пленку (LKB) и вискозную ткань.

При *изоэлектрофокусировании* адсорбированных белков 50 мг микрокристаллической целлюлозы заливали 10 мл супернатанта культуры *T. reesei*, проводили сорбцию при 20° С и перемешивали, через 5 мин осадок отделяли центрифугированием, промывали 10 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,0), 10 мл дистиллированной воды и в виде пасты наносили непосредственно на поверхность полиакриламидного геля. При необходимости сорбцию и промывку фосфатным буфером проводили несколько раз.

Целлофановую пленку (4×10 см) помещали на 1 мин в 20 мл культуральной жидкости, промывали фосфатным буфером и водой. Затем ее накладывали на пластину геля во всю ширину и подавали напряжение на электроды. Через 10 мин пленку переворачивали и проводили электродесорбцию ферментов с ее обратной стороны. После этого целлофан снимали, вновь сорбировали на нем ферменты, промывали и проводили электродесорбцию с обеих сторон. Процедуру сорбции и последующие манипуляции повторяли в общей сложности 5 раз, а затем диффундировавшие в гель белки фокусировали в обычном режиме.

При фокусировании белков, сорбированных на вискозной ткани, использовали кусок размером 2×6 см, на котором трижды проводили сорбцию целлюлаз из культуральной жидкости, чередуя с промывкой фосфатным буфером, затем, после промывки водой, осуществляли электродесорбцию ферментов с обеих сторон ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wood T. M., McCrae S. J. Biochem. J., 1972, v. 128, № 5, p. 1183–1192.
2. Halliwell G., Griffin M. Biochem. J., 1973, v. 135, № 3, p. 587–594.
3. Berghem L. E. R., Petersson L. G. Eur. J. Biochem., 1973, v. 37, № 1, p. 21–30.
4. Shoemaker S. P., Watt K., Tsitovsky G., Cox R. Bio/Techology, 1983, v. 1, № 8, p. 687–690.
5. Gilkes N. R., Langsjord M. L., Kitburn D. G., Miller R. C., Jr., Warren R. A. J. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 16, p. 10453–10459.
6. White T. J., Meade J. H., Shoemaker S. P., Kolts K. E., Innis M. A. Food Technol., 1984, v. 38, № 2, p. 90, 92–95, 98.
7. Nummi M., Niku-Paavola M.-L., Enari T.-M., Rauno V. FEBS Lett., 1980, v. 113, № 2, p. 164–166.
8. Мартынов В. А., Рабинович М. Л., Клесов А. А., Мигких П. В., Гернер М. В. Прикл. биохим. микробиол., 1983, т. 19, № 4, с. 513–520.
9. Носилова Т. В. В кн.: Тезисы докладов VI республиканской конференции молодых ученых-химиков. Таллин, 1985, с. 151.
10. Shoemaker S. P., Raymond J. C., Bruner R. In: Trends Biol. Ferment. Fuels and Chem. Proc. Symp. Upton, N. Y., 7–11 Dec. 1980. N. Y.—L., 1981, p. 81–110.
11. Wood T. M. Cienc. Biol. (Portugal), 1980, v. 5, № 1, p. 27–33.

12. *Rabinovich M. L.* In: Materials of Soviet-Finland seminar on bioconversion of plant raw materials by microorganisms (5-10 December 1983, Tashkent). Pushchino, 1984, p. 31-48.

Поступила в редакцию
6.III.1985
После доработки
12.IV.1985

**SPECIFICITY OF SORPTION OF *TRICHODERMA REESEI*
CELLOBIOHYDROLASE I ON CELLULOSE DERIVATIVES**

RABINOVICH M. L., NOVIKOVA T. V., KLYOSOV A. A., BEREZIN I. V.

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A new separation technique was developed based on the affinity sorption and subsequent analytical isoelectric focusing of proteins bound to affinity carrier. Using such an approach, the components of *Trichoderma reesei* cellulase complex with high affinity to cellulose were identified. With microcrystalline cellulose as affinity matrix, the most strongly adsorbed components were cellobiohydrolase I (pI 4,2) and 2-3 its isozymes (pI 3,8-4,0), as well as endoglucanase I (pI 4,7) and its minor forms (pI 4,3-4,8). Cellophane and viscose were more selective sorbents for the major form of cellobiohydrolase I (pI 4,2). A new method for selective determination of cellobiohydrolase I in crude extracts of new producer strains was developed basing on these data.