



УДК 577.152.321*4'135

**НЕПРЕРЫВНЫЙ ФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ И ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ
МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЭНДО-1,4-β-ГЛЮКАНАЗ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 4-МЕТИЛУМБЕЛЛИФЕРИЛ-β-D-
ЦЕЛЛОБИОЗИДА В КАЧЕСТВЕ СУБСТРАТА****Черноглазов В. М., Талебаровская И. К., Джафарова А. Н.,
Глесов А. А.***

Химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова;

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

Разработан способ определения активности высокоочищенной эндо-1,4-β-глюканазы из микроскопического гриба *Trichoderma reesei* с использованием 4-метилумбеллиферил-β-D-целлобиозида. Методом ВЭЖХ показано, что данный субстрат способен расщепляться эндоглюканазой с образованием преимущественно свободного 4-метилумбеллиферона. K_m реакции составляет 1,25 мМ, k_{cat} равна 7,9 с⁻¹ (30° С, рН 5,0). Продемонстрирована возможность непрерывного фотометрического определения активности фермента при разностном молярном коэффициенте поглощения (λ_{350}) 1600 М⁻¹·см⁻¹.

В настоящее время для определения активности эндо-1,4-β-глюканазы (КФ 3.2.1.4), одного из ключевых ферментов целлюлазного комплекса, в качестве субстрата используется СМ-целлюлоза — замещенный полимерный аналог целлюлозы. При этом для контроля за ходом реакции применяются вискозиметрический метод или регистрация образующихся в ходе реакции восстанавливающих сахаров одним из многочисленных способов [1, 2]. Оба подхода, хотя и нашли широкое применение, имеют ряд недостатков. Так, несмотря на то что вискозиметрический метод обладает достаточно высокой чувствительностью, расчет абсолютной активности (в молях расщепляемых связей в единицу времени) проводится с определенными допущениями, присущими физической химии полимеров [2]. Альтернативный метод — детекция восстанавливающих сахаров — имеет значительную погрешность, обусловленную различным влиянием степени замещения карбоксиметилированного субстрата на активность ферментов из различных источников. Поэтому стоящие перед исследователями в области ферментативного гидролиза целлюлозы задачи сравнительного изучения множественных форм ферментов из различных микробных источников, а также получения рекомбинантных целлюлаз делает крайне актуальной задачу разработки простых, высокочувствительных методов детекции и количественного определения целлюлолитических ферментов.

Целью настоящей работы явилось изучение возможности определения активности эндо-1,4-β-глюканазы *Trichoderma reesei* с использованием в качестве субстрата 4-метилумбеллиферил-β-D-целлобиозида. Предпосылками для этого послужило сообщение авторов работ [3, 4] о том, что высокоочищенная эндоглюканаза *T. reesei*, как и целлобиогидролаза, способна расщеплять MUF-целлобиозид с образованием в качестве одного из продуктов реакции свободного MUF, а также успешное применение соответствующих MUF-глюкозидов для изучения механизма действия лизоцима, амилазы и других эндополимераз [5]. Однако возможность определения эндо-1,4-β-D-глюканазы с использованием MUF-целлобиозида в качестве субстрата требовала предварительного изучения ряда вопросов.

* Нестандартное сокращение: MUF — 4-метилумбеллиферон.

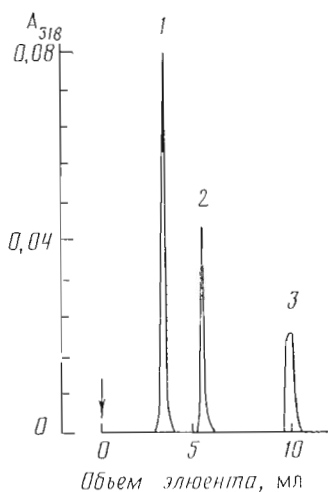


Рис. 1

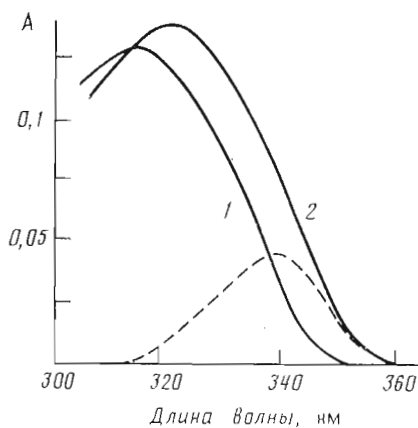


Рис. 2.

Рис. 1. Разделение и фотометрическое определение MUF (1), MUF-глюкозида (2) и MUF-целлобиозида (3) методом ВЭЖХ. Концентрация субстрата и продукт $5 \cdot 10^{-5}$ М. Условия анализа описаны в «Экспер. части»

Рис. 2. УФ-спектры поглощения MUF-целлобиозида (1) и MUF (2) в интервале длин волн 300—360 нм. Пунктиром обозначен разностный спектр поглощения. Условия: 25°C , pH 5,0; 2% DMSO, 0,05 М Na-ацетатный буфер. Концентрация MUF и MUF-целлобиозида 10^{-5} М

Исходным вопросом, на который следовало получить ответ, был вопрос относительно способности эндогликоканазы — деполимеризующего фермента — расщеплять низкомолекулярный синтетический субстрат именно по связи целлобиоза—MUF с образованием свободного фенола. При осуществлении параллельного гидролиза по β -1,4-гликозидной связи спектральные методы анализа оказались бы неприемлемыми ввиду идентичности спектров MUF-производных олигосахаридов со степенью полимеризации от 1 до 6 [6, 7]. Ответ на этот вопрос удалось получить с помощью метода ВЭЖХ, разработанного нами для детекции MUF-целлобиозида и всех возможных продуктов реакции. Как видно из рис. 1, в разработанных условиях удается добиться полного разделения смеси MUF, его глюкозида и целлобиозида. Необходимо подчеркнуть, что разделение MUF и MUF-глюкозида достигается лишь при доведении концентрации ацетонитрила в пробе до 90%, т. е. равной содержанию ацетонитрила в элюенте: в противном случае оба компонента выходят одним пиком.

Профиль элюции реакционной смеси ферментативного гидролиза MUF-целлобиозида свидетельствует о том, что фермент атакует субстрат преимущественно по связи MUF—целлобиоза с освобождением свободного MUF: молярное соотношение MUF и MUF-глюкозида составляет в условиях реакции 4 : 1.

В ходе ВЭЖХ продуктов гидролиза MUF-целлобиозида не наблюдалось каких-либо более высокомолекулярных хромогенных гликозидов, не было также лаг-периода на кинетической кривой образования MUF. Эти факты являются принципиально важными и свидетельствуют, что в условиях эксперимента (вплоть до концентрации субстрата 3 мМ*) эндогликоканазы осуществляет прямой гидролиз MUF-целлобиозида и не образует продуктов трансгликозилирования. Все это создало реальные предпосылки для определения активности фермента флуориметрическим и фотометрическим методами.

Свободный MUF в депротонированной форме имеет максимум поглощения при 360 нм, максимум испускания флуоресценции при 455 нм [6, 7]. Эти значения существенно отличаются от максимумов поглощения (λ_{max} 318 нм) и испускания ($\lambda_{\text{max}} = 455$ нм) MUF-производных олигосахаридов.

* Показано специальным экспериментом.

что создает возможность высокочувствительной детекции продуктов реакции флуориметрическим методом. Однако для большинства гликозидаз, имеющих рН-оптимум в интервале рН 4—6, непрерывный флуориметрический метод регистрации кинетики невозможен ввиду высокого значения pK MUF, равного 7,8 [8]. Поэтому регистрация накопления MUF в реакционной смеси проводится путем отбора проб, доведения в них рН до значения выше 10 и измерения флуоресценции ($\lambda_{\max} = 455$ нм) с определением концентрации MUF по калибровочной прямой. Как показали эксперименты, такой вариант регистрации концентраций продукта позволяет количественно регистрировать MUF на уровне $10^{-10} - 10^{-11}$ М с относительной ошибкой на уровне 10%.

Однако, несмотря на данные предпосылки, для высокочувствительного определения активности целлюлаз с использованием MUF-целлобиозида в качестве субстрата необходимо было выяснить, каковы эффективные значения константы связывания и K_{cat} эндоглиюканазы по отношению к MUF-целлобиозиду, насколько сопоставимы они с соответствующими параметрами реакции гидролиза полимерного субстрата — СМ-целлюлозы. При определении значений кинетических параметров по скорости образования MUF флуориметрическим методом оказалось, что MUF-целлобиозид обладает высоким сродством к эндо-1,4- β -глюкоканазе (K_m $1,2 \pm 0,1$ мМ), а значение максимальной скорости образования MUF, характеризующее активность фермента, составляет для эндоглиюканазы *T. reesei* 9 мкмоль/мин на 1 мг белка, т. е. k_{cat} равна $7,9 \text{ с}^{-1}$ (30°C , рН 5,0). Эти значения незначительно уступают активности и степени сродства данного фермента (регистрируемых вискозиметрическим методом) по отношению к СМ-целлюлозе (K_m 0,1 мМ, k_{cat} 10 с^{-1}) [2, 9]. Это позволяет использовать MUF-целлобиозид в качестве субстрата эндоглиюканаз, осуществлять флуориметрическое определение активности с чувствительностью на уровне 10^{-5} мкМ/мин, что дает минимум на порядок по сравнению с СМ-целлюлозой выигрыш в чувствительности [2, 9]. Все это подтверждает имеющиеся в литературе по экзоцеллобиогидролазе [4, 10], лизоциму и α -амилазе [5] данные об аномально высоком сродстве по отношению к гликозидазам и реакционной способности MUF-гликозидов по сравнению с соответствующими олигосахаридами и их нитрофенильными производными.

Несмотря на высокую чувствительность, флуориметрический способ регистрации кинетики гидролиза MUF-целлобиозида не позволяет проводить непрерывное определение активности. Это связано с тем, что, как уже отмечалось, в интервале рН 4—6 — рН-оптимуме действия большинства целлюлолитических ферментов из микроскопических грибов MUF находится в протонированном состоянии. Поэтому третьим вопросом, на который необходимо было дать ответ, был вопрос относительно возможности непрерывного фотометрического определения активности эндоглиюканазы.

Максимумы поглощения и молярные коэффициенты поглощения субстрата и продуктов при рН 4—6 весьма близки: 318 нм для MUF-целлобиозида и 322 нм для MUF. Тем не менее, как было продемонстрировано в работе [6], существует участок в интервале длин волн 340—350 нм, где разностный спектр двух соединений становится весьма значительным при минимальном поглощении субстрата, что позволяет реализовать метод непрерывной регистрации кинетики. На рис. 2 приведен участок УФ-спектров поглощения MUF-целлобиозида и MUF, полученные регистрацией спектров исходного субстрата и продуктов исчерпывающего гидролиза (глюкозы и MUF, по данным ВЭЖХ) под действием высокоочищенной целлобиазы. Начиная с 360 нм разностный коэффициент поглощения возрастает и достигает максимального значения $4500 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ при длине волны 340 нм. Однако в силу значительного поглощения субстрата при данной длине волны для дальнейшей работы было выбрано значение $\lambda = 350$ нм, при котором $\Delta\epsilon = 1600 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, а молярный коэффициент поглощения субстрата составляет $200 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Эти значения позволяют работать при концентрациях субстрата вплоть до 3 мМ

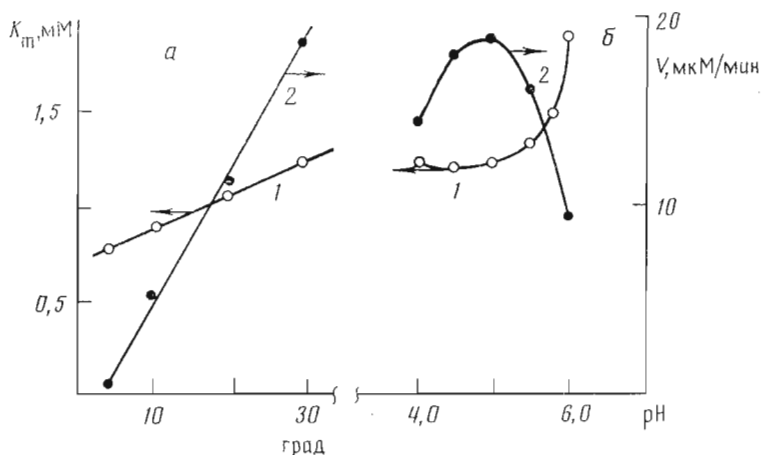


Рис. 3. Зависимость K_m (1) и V (2) реакции образования MUF из MUF-целлобиозида под действием эндоглюканазы IV *T. reesei* в зависимости от температуры при pH 5,0 (а) и pH при 30° С (б) раствора. Стандартные условия: 0,05 М ацетатный буфер, концентрация фермента $2 \cdot 10^{-3}$ мг/мл

и выше, т. е. в условиях насыщения по субстрату, и регистрировать накопление MUF в реакционной среде на уровне 10^{-5} — 10^{-6} М/мин. Важно, что образующийся под действием эндоглюканазы MUF-глюкозид не влияет в этих условиях на величину $\Delta\epsilon$, поскольку имеет те же спектральные параметры, что и исходный субстрат.

На рис. 3 приведены значения эффективных констант Михаэлиса и максимальной скорости реакции образования MUF из MUF-целлобиозида под действием эндоглюканазы IV *T. reesei* в зависимости от температуры (а) и pH (б). Результаты имеют типичный для данного фермента вид [9] и полностью согласуются с данными, полученными при использовании в качестве субстрата высокомолекулярной СМ-целлюлозы. Однако по сравнению с традиционными методами применение MUF-целлобиозида имеет ряд существенных преимуществ: 1) определенность структуры субстрата и возможность количественного определения всех возможных продуктов реакции; 2) непрерывную фотометрическую регистрацию кинетики реакции, возможность приготовления раствора субстрата непосредственно в спектрофотометрической кювете и определение его концентрации по молярному коэффициенту поглощения, что значительно повышает точность определения параметров; 3) относительно высокое средство эндоглюканазы к субстрату, что позволяет работать при низких его концентрациях (< 3 мМ) в отсутствие гидролиза через трансгликозилирование и низком уровне фона, обусловленном поглощением рабочего раствора MUF-целлобиозида; 4) высокую реакционную способность MUF-целлобиозида, приводящую к величинам удельной активности эндоглюканазы, сравнимой с активностью по отношению к СМ-целлюлозе.

Непрерывный фотометрический способ определения активности эндоглюканазы не заменяет полностью методы определения активности с использованием СМ-целлюлозы, поскольку не позволяет регистрировать активность фермента в присутствии других компонентов целлюлазного комплекса. Однако, на наш взгляд, он будет весьма полезен при сравнительном изучении высокоочищенных ферментов из различных источников.

Экспериментальная часть

В работе использована высокоочищенная эндо-1,4- β -глюканаза IV *Trichoderma reesei* с молекулярной массой 53 000, рI 4,65, удельной вискозиметрической активностью 20 ед./мг белка и активностью по скорости образования восстанавливающих сахаров из СМ-целлюлозы 70 ед./мг (40° С, pH 5,0). Схема очистки и биохимические характеристики ферментов приведены в работе [9], методы определения активностей подробно изложены в работе [2]. Определение проводили с использованием 0,5% раствора СМ-целлюлозы (Sigma, США) в 0,1 М ацетатном буфере.

MUF-целлобиозид синтезировал по методу, подробно описанному в работе [11], MUF-глюкозид — препарат производства фирмы Sigma. Растворы субстрата и свидетелей для ВЭЖХ готовили растворением навески в DMSO с последующим разведением буфером из расчета 2% содержания DMSO в реакционной смеси. Растворы стабильны в течение нескольких недель. Концентрацию субстрата контролировали по молярному коэффициенту поглощения при 318 нм, равному $13000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Разделение и количественное определение субстратов и продуктов реакции осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Крауер (ФРГ). Условия анализа: колонка — Silasorb-NH₂, 5 мкм, $4,6 \times 250$ мм, элюент — ацетонитрил — вода (90 : 10), 1 мл/мин, 80 атм, 25° С, объем вводимой пробы 20 мкл, УФ-детектор, 318 нм. Анализируемый раствор предварительно разводили ацетонитрилом до содержания последнего в пробе 90%.

УФ-спектры поглощения растворов снимали на спектрофотометре Hitachi-124 (Япония), снабженном термостатируемым кюветным отделением. Необходимую для спектральных и кинетических экспериментов температуру (0—40° С) поддерживали с помощью термостата Multitemp II (ЛКВ, Швеция). Реакционную смесь готовили непосредственно в 1-см спектрофотометрической кювете. Для этого в кювету вводили необходимое (0,05—1,0 мл) количество запасного раствора MUF-целлобиозида (5 мМ), доводили объем до 2,5—3,0 мл буфером с нужным значением pH, термостатировали раствор в кюветном отделении спектрофотометра, добавляли 5—30 мкл раствора фермента и регистрировали кинетику. Реакции проводили в 0,05 М Na-ацетатном буфере (pH 3,5—6,0) или 0,05 М Na-фосфатном буфере с pH 7,0.

Эксперименты по флуориметрической регистрации кинетики гидролиза MUF-целлобиозида проводили в термостатируемых пробирках объемом 5 мл при концентрации субстрата 0,05—3,0 мМ. Для определения флуоресценции к аликвоте анализируемого раствора (0,25 мл) добавляли 10-кратный избыток 0,2 М глицинового буфера с pH 10,3 и определяли значение флуоресценции на спектрофлуориметре Hitachi-524: $\lambda_{\text{возб}} = 360$ нм, $\lambda_{\text{исп}} = 455$ нм, ширина щели 10 нм. Концентрацию MUF рассчитывали исходя из калибровочной прямой в диапазоне концентраций 10^{-9} — 10^{-11} М.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ghose T., Montenecourt B. S., Eveleigh D. E. Measurement of cellulase activity (substrates, assays, activities and recommendations). 1981, IUPAC Commission of Biotechnology, 113 p.
2. Класов А. А., Рабинович М. Л., Синицын А. П., Чурилова Н. В., Григораш С. Ю. // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. № 8. С. 1225—1242.
3. Tilbeurgh H., Claeysens M., de Bruyne C. K. // FEBS Lett. 1982. V. 149. № 1. P. 152—156.
4. Tilbeurgh H., Claeysens M. // FEBS Lett. 1985. V. 187. № 2. P. 283—288.
5. Класов А. А. Ферментативный катализ. Ч. 2. М.: МГУ, 1984. С. 192—194.
6. Rosenthal A. L., Suijfer A. // Anal. Biochem. 1973. V. 55. № 1. P. 85—92.
7. De Boeck H., Matta K. L., Claeysens M., Shanon N., Loontjens F. // Eur. J. Biochem. 1983. V. 131. № 2. P. 453—460.
8. Koller E., Wolfbeis O. S. // Anal. Biochem. 1984. V. 143. № 1. P. 146—151.
9. Черноглазов В. М., Ермолова О. В., Класов А. А. // Биохимия. 1985. Т. 50. № 7. С. 1108—1119.
10. Tilbeurgh H., Pettersson G., Brikabhat R., de Boeck H., Claeysens M. // FEBS Lett. 1985. V. 187. № 2. P. 229—235.
11. Conctantzas N., Kocconer J. // Coll. Czech. Chem. Commun. 1959. V. 24. № 4. P. 1099—1108.

Поступила в редакцию
7.V.1987

После доработки
24.XI.1987

CONTINUOUS PHOTOMETRIC AND FLUOROMETRIC DETERMINATION OF THE ACTIVITY OF ENDO-1,4- β -GLUCANASES (CELLULASES) USING 4-METHYLBELLIFERYL β -D-CELLOBIOSIDE AS A SUBSTRATE

CHERNOGLASOV V. M., TALEBAROVSKAYA I. K., DZHAFAROVA A. N.,
KLYOSOV A. A.*

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University;
* A. N. Bach Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A method of determination of the endoglucanase activity exemplified by a highly purified endo-1,4- β -endoglucanase from *Trichoderma reesei*, has been developed using 4-methylumbelliferyl β -D-cellobioside as substrate. As shown by HPLC, the endoglucanase cleaved the substrate to yield 4-methylumbelliferone (mainly non-protonated under conditions studied), K_m was 1,25 mM and V_m 7,9 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein (30° С, pH 5,0). It was also shown that continuous photometric detection of the enzymatic activity is possible, with the differential coefficient of molar extinction $1600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.