



УДК 577.154.33.08

## ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

II \*. СВОЙСТВА КОМПОНЕНТОВ ЦЕЛЛЮЛАЗНЫХ КОМПЛЕКСОВ  
ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ

*Глесов А. А., Рабинович М. Л., Чурилова И. В.,  
Синицын А. П., Григораш С. Ю., Тихонова Т. В.,  
Малиновская Л. М.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
химический факультет, кафедра химической энзимологии*

Проведено сравнительное изучение кинетических и сорбционных характеристик эндогликоаназ, целлобиаз и «арил-β-глюкозидаз» целлюлазных препаратов из различных источников. Показано, что способность ферментов адсорбироваться на нерастворимой целлюлозе варьируется в широких пределах для препаратов различного происхождения, в то время как способность связывать растворимые спедифические субстраты (в частности, карбоксиметилцеллюлозу и целлобиозу) достаточно близка для соответствующих ферментов из различных источников. Данные, полученные с использованием корреляций между активностями различных компонентов целлюлазных препаратов, а также результаты изучения кинетики ферментативного гидролиза растворимых и нерастворимых субстратов, ингибирования соответствующих реакций глюкозой, целлобиозой и глюконо-δ-лактоном, изучения зависимостей ферментативных реакций от pH, инактивации ферментов при повышенных температурах и кинетики инактивации под действием кавитационного ультразвука позволили заключить, что «арил-β-глюкозидазная» активность во многих случаях не имеет прямого отношения к целлюлолитическим ферментам и определение этой активности с использованием арил-β-глюкозидов пока не является информативным для характеристики целлюлазных комплексов.

Гидролитическое расщепление целлюлозы до глюкозы происходит в результате последовательно-параллельного действия нескольких ферментов, образующих так называемый целлюлазный комплекс. В состав целлюлазного комплекса в общем случае входят эндо-1,4-β-глюкоаназы (КФ 3.2.1.4), экзо-1,4-β-целлобиогидролазы (КФ 3.2.1.91), экзо-1,4-β-глюкозидазы (КФ 3.2.1.74) и целлобиазы (КФ 3.2.1.21). Последнюю группу карбогидраз называют также β-глюкозидазами. Согласно последнему изданию «Номенклатуры ферментов» [2], оба названия являются синонимами, и им соответствует один классификационный номер (3.2.1.21). В настоящей работе будет показано, что данное положение в достаточной степени устарело и что существует целый набор не всегда перекрывающихся целлобиаз и β-глюкозидаз из различных источников. Более того, целый ряд β-глюкозидаз в отличие от целлобиаз не играет роли в гидролизе целлюлозы и не входит, строго говоря, в состав целлюлазных комплексов.

Как было подчеркнуто в предыдущей статье [1], целью данной серии работ является создание общей концепции ферментативного гидролиза цел-

\* Сообщение I см. [1].

люлозы. При этом необходимо принимать во внимание, что свойства целлюлолитических ферментов из различных организмов могут в определенной степени различаться. Это касается в первую очередь таких свойств, как термостабильность, зависимость активности и стабильности от pH, значения кинетических параметров гидролитических реакций, чувствительность к ингибированию или активации продуктами реакции, способность адсорбироваться на поверхности нерастворимого субстрата, характер адсорбции, способность к реакциям трансгликозилирования, субстратная специфичность. Выявление характера и масштабов варьирования этих важнейших свойств в зависимости от источника целлюлолитических ферментов и условий реакции важно для интерпретации кажущихся противоречий в механизмах гидролиза целлюлозы под действием целлюлазных комплексов из различных источников. Настоящая работа посвящена сравнительному рассмотрению некоторых физико-химических и кинетических свойств компонентов различных целлюлазных комплексов. Ряд свойств из перечисленных выше представляет специальный интерес, и детальное их рассмотрение будет проведено в последующих статьях данной серии.

*Об отношении «арил-β-глюкозидазной» активности к целлюлазному комплексу.* В предыдущей работе [1] было показано, что большинство целлюлазных комплексов катализирует гидролиз нитрофениловых эфиров β-D-глюкопиранозида с образованием глюкозы и нитрофенола. Роль «арил-β-глюкозидазной» активности в ферментативном гидролизе целлюлозы и ее взаимоотношения с другими активностями целлюлазного комплекса до настоящего времени продолжают оставаться предметом изучения [3—17]. В последние годы ряд авторов путем многостадийного фракционирования целлюлазных комплексов выделили три типа β-глюкозидаз (КФ 3.2.1.21) [6, 9]:

1) целлобиазы, расщепляющие исключительно целлобиозу и не действующие на арил-β-глюкозиды;

2) β-глюкозидгидролазы, обладающие широкой специфичностью по отношению к аглюкопу;

3) арил-β-глюкозидазы, расщепляющие β-глюкозиды, аглюконом которых является ариловый спирт (фенол, *o*- (или) *n*-нитрофенол, салицилин, 6-Br-2-нафтол и др.).

При этом многие из выделенных ферментов имели значительное число форм, различающихся молекулярным весом и другими физико-химическими характеристиками [9, 12]. Однако по-прежнему остаются неясными происхождение этих форм, соотношение и сравнительное значение различных типов β-глюкозидаз в исходных целлюлозных комплексах. Известно, что различные формы ферментов при выделении могут в неодинаковой степени подвергаться инактивации и, следовательно, их соотношение в ходе очистки изменяется. Анализ литературных данных показывает также, что фракционирование ферментов весьма часто приводит к образованию множественных форм в результате ограниченного протеолиза, процессов диссоциации или ассоциации и других явлений. Подобные артефакты, очевидно, возможны и при выделении β-глюкозидаз, во многих случаях имеющих сложную четвертичную структуру.

Так, в работе [18] сообщалось о выделении из эмульсии миндаля двух форм β-глюкозидазы с *M* 67 000 и 75 000—90 000, различающихся по субстратной специфичности, которые в определенных условиях могли ассоциироваться с образованием димера. В то же время в работе [19] из этого же источника выделены β-глюкозидаза с *M* 135 000 и двумя активными центрами и фермент с *M* 90 000 и одним активным центром. Вполне возможно, что подобные различия в физико-химических свойствах могут существенным образом влиять на субстратную специфичность выделяемых биокатализаторов и в зависимости от способа очистки приводить к образованию нескольких узкоспецифичных ферментов или одного фермента с широкой специфичностью. В работах [7, 10] сообщалось о выделении из

целлюлазного комплекса *Trichoderma viride* гомогенной  $\beta$ -глюкозидазы с  $M$  50 000, а авторы работы [11] выделили из этого целлюлозного комплекса три формы  $\beta$ -глюкозидазы с  $M \sim 76$  000. Наконец, при фракционировании целлюлазного препарата *Geotrichum candidum* были выделены 5 целлобиаз и 3 «арил- $\beta$ -глюкозидазы» с  $M$  35 000, 123 000, 188 000 и 223 000 (188 000+35 000), а также ферменты, проявляющие обе активности [9, 12].

Число подобных примеров может быть значительно расширено, причем аналогичная ситуация наблюдается и в отношении других компонентов целлюлазного комплекса (эндо- и экзоглюканазы). В этой связи представляется затруднительным правильно оценить истинный вклад различных форм ферментов в расщепление того или иного субстрата исходным целлюлазным комплексом и выяснить роль этих форм в ферментативной деградации целлюлозы только на основании результатов фракционирования целлюлазного комплекса и изучения свойств выделенных ферментов. В данной работе предлагается комплексный подход к изучению свойств отдельных компонентов целлюлазного комплекса и их роли в ферментативном гидролизе целлюлозы *без предварительного разделения* комплекса на компоненты. В сочетании с методами фракционирования целлюлазного комплекса данный подход позволяет получить наиболее адекватную информацию о роли каждого из компонентов. В настоящей работе этот подход проиллюстрирован при анализе взаимоотношения «целлобиазной» и «арил- $\beta$ -глюкозидазной» активностей в целлюлазных комплексах. Для этой цели нами использованы следующие критерии:

1) анализ соотношений между целлобиазной и «арил- $\beta$ -глюкозидазной» активностями в целлюлазных комплексах различного происхождения, а также в комплексах одних и тех же продуцентов, полученных в различных условиях культивирования;

2) сравнительное изучение характера подавления этих активностей под действием  $\beta$ -глюкозидаз (глюкоза, глюконолактон);

3) анализ кинетики гидролиза целлобиозы и *n*-нитрофенил- $\beta$ -глюкозида под действием целлюлазного препарата при их совместном присутствии;

4) сравнительное изучение зависимостей эффективных кинетических параметров гидролиза целлобиозы и *n*-нитрофенил- $\beta$ -глюкозида целлюлазным комплексом от pH;

5) сравнительный анализ характера инактивации (термической и/или ультразвуковой) различных компонентов целлюлазного комплекса.

Несмотря на то что каждый из перечисленных критериев является косвенным, их совокупность в сочетании с имеющимися в литературе данными по фракционированию целлюлазных комплексов позволила нам с достоверностью показать, что «арил- $\beta$ -глюкозидазная» активность во многих случаях не имеет прямого отношения к целлюлазному комплексу и отражает или активность неспецифической  $\beta$ -глюкозидазы, или побочное проявление активности целлобиазы.

Это положение можно обосновать следующим образом. Если представить данные по активностям целлюлазных комплексов из различных источников, полученные в предыдущей работе [1], в виде зависимости «арил- $\beta$ -глюкозидазной» активности этих комплексов от соответствующей активности целлобиазы (рис. 1), то большинство препаратов можно условно подразделить на две группы. В одной из них при значительном увеличении активности целлобиазы целлюлазных комплексов (практически от 0 до 3400 ед. акт./г) «арил- $\beta$ -глюкозидазная» активность изменяется незначительно (нижний пунктир на рис. 1). К этой группе принадлежат все целлюлазные комплексы из аспергиллов (*Asp. niger*, *Asp. terreus* и *Asp. foetidus*). По-видимому, целлобиазы этих препаратов практически не проявляют «арил- $\beta$ -глюкозидазную» активность (другими словами, незначительная «арил- $\beta$ -глюкозидазная» активность этих комплексов вызвана

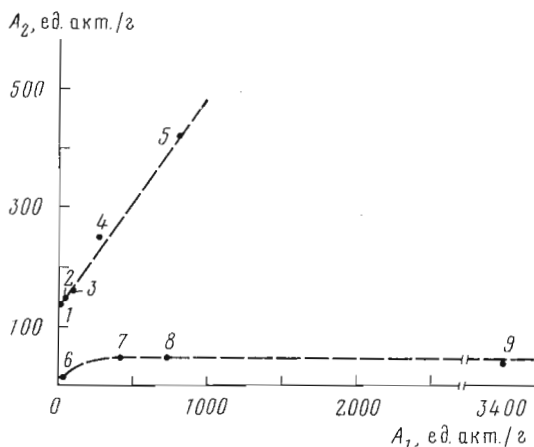


Рис. 1. Взаимосвязь между целлюлазной ( $A_1$ ) и «арил- $\beta$ -глюкозидазной» ( $A_2$ ) активностью целлюлазных комплексов из *T. koningii* (1, 2), *T. lignorum* (3, 4), *G. candidum* (5), *Asp. terreus* (6), *Asp. niger* производства «Serva» (7), *Asp. niger* (8), *Asp. foetidus* (9). Данные по активностям приведены в работе [4]

другими ферментными компонентами, а не целлюбиазами). Вторая группа препаратов проявляет значительно более высокую «арил- $\beta$ -глюкозидазную» активность, причем последняя заметно возрастает с повышением активности целлюбиазы (верхний пунктир на рис. 1). Сюда относится ряд целлюлазных комплексов *Trichoderma* и *Geotrichum*. Можно полагать, что в этих препаратах присутствуют целлюбиазы, обладающие сопутствующей «арил- $\beta$ -глюкозидазной» активностью. Действительно, в целлюлазных комплексах из *T. viride* и *G. candidum* недавно обнаружены  $\beta$ -глюкозидазы, катализирующие гидролиз как целлюбиозы, так и *n*-нитрофенил- $\beta$ -*D*-глюкозида [7, 12, 16]. Однако «арил- $\beta$ -глюкозидазную» активность этих комплексов нельзя приписать только целлюбиазам. Об этом, в частности, свидетельствует тот факт, что продолжение верхней пунктирной прямой на рис. 1 пересекает ось ординат (в точке, соответствующей нулевой активности целлюбиазы) при достаточно высоком уровне «арил- $\beta$ -глюкозидазной» активности. По-видимому, часть этой активности следует приписать или некоторым  $\beta$ -глюкозидазам (пещеллюбиазного характера), или другим компонентам целлюлазного комплекса.

Различные целлюлазные препараты характеризуются не только различным соотношением целлюлазной и «арил- $\beta$ -глюкозидазной» активности, но и разным соотношением соответствующих констант Михаэлиса (табл. 1). Для всех изученных нами препаратов величина  $K_m$  гидролиза целлюбиозы заметно превышает соответствующую величину для гидролиза *n*-нитрофенилглюкозида, причем отношение этих констант в данном случае варьируется от 3 (*Asp. niger*) до 30 (*T. lignorum*). Эти различия нельзя объяснить только влиянием аглюконового остатка субстратов, поскольку, как будет показано ниже для препарата из *G. candidum*, константы конкурентного ингибирования глюкозой для обоих процессов также различаются и близки к соответствующим константам Михаэлиса для действия целлюбиазы и «арил- $\beta$ -глюкозидазы». Это может означать, что целлюбиоза и *n*-нитрофенилглюкозид сорбируются на различных центрах и, возможно, расщепляются под действием различных ферментов.

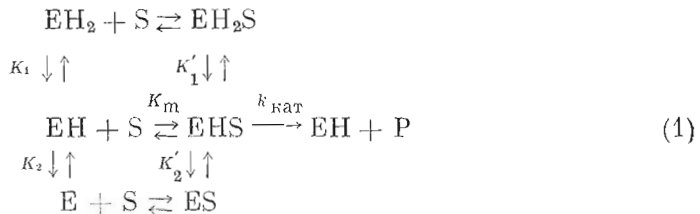
Последнее положение подтверждается также анализом зависимостей гидролиза целлюбиозы и *n*-нитрофенилглюкозида под действием целлюлазных препаратов из различных источников от pH (табл. 2). Влияние pH на кинетику гидролиза во всех случаях описывалось обычной схемой

Значения констант Михаэлиса для гидролиза целлобиозы и *n*-нитрофенилгликозида (*n*-НФГ) под действием целлюлазных препаратов из различных источников (40° С, рН 4,5)

Источник	$K_m \cdot 10^3, M$	
	целлобиоза	<i>n</i> -НФГ
<i>Aspergillus niger</i>	2,0±0,2	0,67±0,06
<i>Trichoderma lignorum</i> I	2,0±0,3	0,06±0,005
<i>Geotrichum candidum</i>	2,0±0,4	0,35±0,03
<i>Asp. terreus</i>	3,8±0,5	0,28±0,02
<i>Rapidase</i> *	—	0,19±0,05

\* Препарат практически неактивен по отношению к целлобиозе.

с двухступенчатой диссоциацией ионогенных групп активного центра в предположении, что каталитически активна только «нейтральная» форма (см. «Экспериментальную часть»)



Из табл. 2 видно, что связывание обоих субстратов с соответствующими ферментами не приводит к заметному изменению констант диссоциации ионогенных групп активного центра ( $pK_1 \approx pK'_1$ ,  $pK_2 \approx pK'_2$ , см. схему 1). Вместе с тем в гидролизе *n*-нитрофенилгликозида принимают участие более сильная кислота и более сильное основание, чем в гидролизе целлобиозы (см. табл. 2). Поскольку эти величины  $pK$  характеризуют и свободную (не подверженную влиянию субстрата) форму фермента, то можно полагать, что гидролиз целлобиозы и *n*-нитрофенилгликозида происходит под действием различных ферментов.

Основная часть «арил-β-гликозидазной» активности не может быть приписана действию таких индивидуальных компонентов целлюлазного комплекса, как эндогликаназа, экзогликозидаза и целлобиаза. Об этом свидетельствуют приведенные ниже данные по инаktivации целлюлазного препарата из *G. candidum* под действием кавитационного ультразвука. Этот подход был положен в основу нового метода определения состава и свойств отдельных компонентов полиферментных систем без их предварительного разделения [20]. Согласно данному методу, изучение зависимости констант скоростей ультразвуковой инаktivации ферментов от рН (выявляемых с использованием определенного набора субстратов) должно приводить к соответствующим рН-профилям. Характер этих профилей определяется, во-первых, величинами  $pK$  ионогенных групп, контролирующих нативную конформацию фермента (и, следовательно, регулирующих доступность активного центра инаktivированному действию свободных радикалов, генерируемых в растворе кавитационным ультразвуком [20, 21]), и, во-вторых, величиной константы скорости инаktivации активного центра в наиболее (или наименее) стабильной конформации. Так как комбинации этих величин должны быть индивидуальными для большинства ферментов, то использование определенного набора субстратов для

Значения  $pK$  ионогенных групп \*, участвующих в гидролизе целлобиозы и  $n$ -нитрофенилгликозида ( $n$ -НФГ) под действием целлюлазных препаратов из различных источников ( $40^{\circ}C$ )

Источник	Гидролиз целлобиозы				Гидролиз $n$ -НФГ			
	Свободный фермент		Фермент-субстратный комплекс		Свободный фермент		Фермент-субстратный комплекс	
	$pK_1$	$pK_2$	$pK'_1$	$pK'_2$	$pK_1$	$pK_2$	$pK'_1$	$pK'_2$
<i>G. candidum</i>	3,7	5,6	3,7	5,6	2,7	6,2	2,3	5,8
<i>Asp. niger</i>	3,8	5,5	3,8	5,3	3,1	6,3	3,0	5,5
<i>T. lignorum</i> I **					3,0	6,1	—	5,6
Rapidase **					3,5	6,0	—	6,0
<i>Asp. terreus</i>					3,7	6,2	3,5	6,6

\* Погрешность в определении величин  $pK$  составляет  $\pm 0,2$  ед.

\*\* Препараты практически неактивны по отношению к целлобиозе.

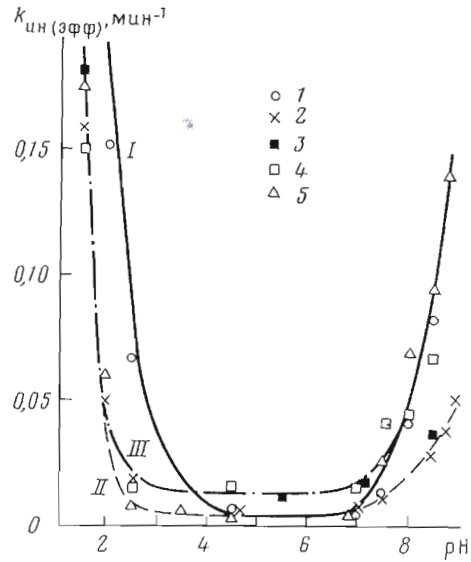
изучения полиферментной системы позволяет сделать вывод о минимальном числе ферментов в системе, об их свойствах (в отношении зависимостей ультразвуковой инактивации от pH), а также о субстратной специфичности отдельных компонентов полиферментного комплекса.

На основании известных данных о субстратной специфичности целлюлолитических ферментов [1, 20, 22, 23] из рис. 2 можно заключить, что в целлюлазном комплексе из *G. candidum* содержатся по меньшей мере четыре фермента, действующих на гликозидную связь. Эти ферменты различаются не только субстратной специфичностью, но и значениями констант ионизации групп, контролирующей зависимость ультразвуковой инактивации от pH, а также значениями констант скоростей инактивации наиболее стабильных к действию ультразвука ионогенных форм фермента. Так, из рис. 2 видно, что профиль зависимости инактивации «арил- $\beta$ -гликозидазы» от pH индивидуален и не совпадает с соответствующими профилями для эндогликаназы (регистрируемой вискозиметрическим методом по гидролизу растворимой карбоксиметилцеллюлозы), экзогликозидазы (регистрируемой по образованию глюкозы из карбоксиметилцеллюлозы в присутствии эндогликаназы) и целлобиазы (регистрируемой по гидролизу целлобиозы). От первых двух ферментов «арил- $\beta$ -гликозидаза» из *G. candidum* отличается величинами  $pK$  ионогенных групп, контролирующих скорость ультразвуковой инактивации, а от последнего фермента — величиной константы скорости инактивации «нейтральной» формы активного центра (рис. 2). Таким образом, «арил- $\beta$ -гликозидазная» активность *G. candidum* не может быть приписана целлобиазе, эндогликаназе или экзогликозидазе. По-видимому, она обусловлена присутствием  $\beta$ -гликозидаз нецеллюлазного происхождения.

Следует также отметить, что ионизация каталитических групп активного центра целлобиазы и «арил- $\beta$ -гликозидазы» из *G. candidum* не приводит к изменению констант скоростей ультразвуковой инактивации этих ферментов (ср. табл. 2 и рис. 2). Данный факт позволяет утверждать, что ионизация каталитически активных групп целлобиазы и «арил- $\beta$ -гликозидазы» не сопровождается сколько-нибудь заметным изменением конфигурации их активных центров (во всяком случае, изменением их доступности окружающей среде) в свободном ферменте.

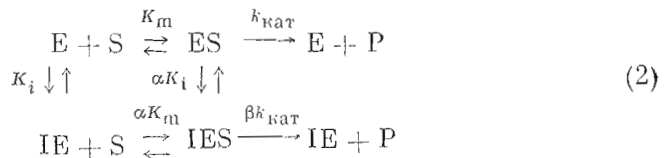
Целлобиаза и «арил- $\beta$ -гликозидаза» из *G. candidum* обнаруживают также определенные различия в способности связывать как глюкозу, так и целлобиозу. Глюкоза является конкурентным ингибитором обоих ферментов, но соответствующие константы ингибирования различаются и составляют  $(2 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$  и  $(0,6 \pm 0,05) \cdot 10^{-3}$  М для целлобиазы и «арил- $\beta$ -

Рис. 2. Зависимости эффективных констант скоростей инактивации ферментов целлюлазного комплекса из *G. candidum* под действием ультразвука от pH. Ферментативные активности определяли, используя в качестве субстратов СМ-целлюлозу (1 – вискозиметрический метод; 2 – определение образующихся восстанавливающих сахаров; 3 – определение образующейся глюкозы), целлобиозу (4 – определение глюкозы) и *n*-нитрофенилглюкозид (5 – определение *n*-нитрофенола). Теоретические кривые построены с использованием схемы 7 и уравнения 8 для значений констант:  $pK_1$  2,2,  $pK_2$  8,8,  $k_{ин}$  0,005 мин<sup>-1</sup> (I);  $pK_1$  1,5,  $pK_2$  10,  $k_{ин}$  0,005 мин<sup>-1</sup> (II);  $pK_1$  1,5,  $pK_2$  9,  $k_{ин}$  0,015 мин<sup>-1</sup> (III)



глюкозидазы» соответственно. Следует отметить, что константы ингибирования обоих ферментов глюкозой близки к соответствующим константам Михаэлиса, которые равны  $2 \cdot 10^{-3}$  М для гидролиза целлобиозы и  $0,35 \cdot 10^{-3}$  М для гидролиза *n*-нитрофенилового эфира  $\beta$ -D-глюкопиранозиды под действием целлюлазного препарата из *G. candidum* (табл. 1). Этот факт позволяет предположить, что различие в константах Михаэлиса для гидролиза обоих субстратов обусловлено не влиянием аглюкона (если бы субстраты связывались одним ферментом на одном и том же сорбционном центре), а тем, что связывание целлобиозы и *n*-нитрофенилглюкозида в процессе их ферментативного гидролиза происходит на разных сорбционных центрах и, видимо, различными ферментами.

Целлобиоза ингибирует гидролиз *n*-нитрофенилглюкозида под действием целлюлазного препарата *G. candidum*, причем ингибирование имеет смешанный характер (рис. 3а). Формально-кинетический анализ ингибирования в рамках схемы (см. «Экспериментальную часть»)



позволил найти значение константы связывания целлобиозы ( $K_1$   $1,5 \cdot 10^{-3}$  М), а также величины  $\alpha$  (2,8), характеризующей степень взаимозависимости связывания субстрата и ингибитора, и  $\beta$  (0,13), характеризующей степень подавления ферментативной активности в тройном комплексе. Поскольку данный эксперимент был поставлен так, что регистрировались лишь начальные скорости образования *n*-нитрофенола и степень гидролиза добавленной целлобиозы была пренебрежимо мала, формально-кинетический анализ (рис. 3б, в) представляется достаточно корректным. Более того, легко показать, что смешанный характер ингибирования не может интерпретироваться наличием в данной системе двух «арил- $\beta$ -глюкозидаз» с близкими активностями, одна из которых ингибируется целлобиозой конкурентно, а другая неконкурентно (или вообще не ингибируется), поскольку в таком случае не наблюдалось бы линейности кинетических данных в координатах Лайнуивера – Берка (см. рис. 3а). Таким образом, целлобиоза способна связываться с «арил- $\beta$ -глюкозидазой» с константой, близкой к соответствующей константе Михаэлиса для целло-

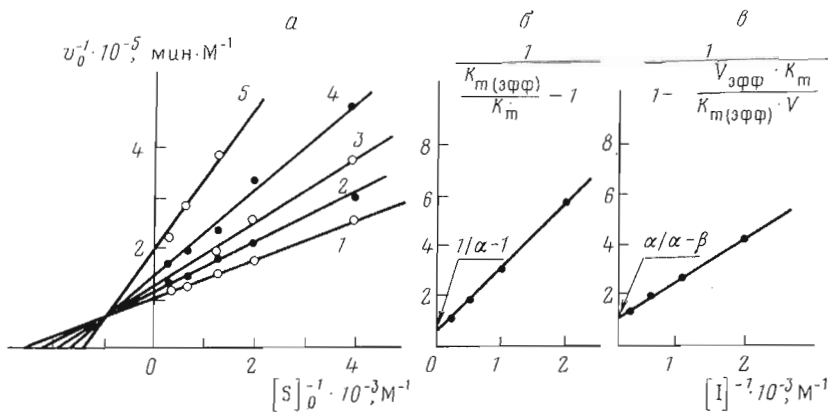


Рис. 3. Влияние целлобиозы на начальные скорости гидролиза *p*-нитрофенилглюкозида под действием целлюлазного препарата из *G. candidum* (0,5 г/л): а — линейарзация в координатах Лайнуивера — Берка; концентрации целлобиозы: 0 (1), 0,5 (2), 1 (3), 2 (4), 5 · 10<sup>-3</sup> М (5); б, в — кинетический анализ смешанного ингибирования (см. схему 1)

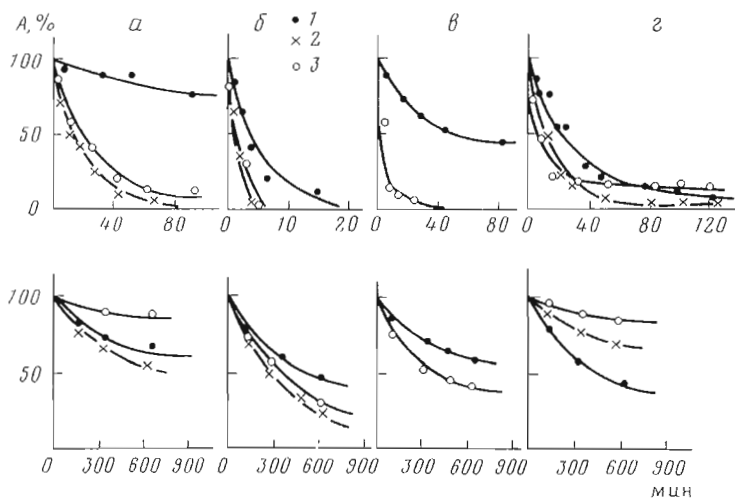


Рис. 4. Инактивация целлюлазных препаратов из *Asp. niger* (а), *T. lignorum* (б), Rapidase (в), *G. candidum* (г) 50°С (нижние графики) и 67°С (верхние графики). Измеряли эндоглюканазную (1), целлобиазную (2) и арил-β-глюкозидазную (3) активности, рН 4,5

биазы. Однако целлобиоза при этом лишь частично конкурирует с *p*-нитрофенилглюкозидом (ухудшая связывание последнего лишь в 3 раза) и не полностью (в 8 раз) подавляет активность «арил-β-глюкозидазы». Как видно, и эти эксперименты указывают на различную природу целлобиозы и «арил-β-глюкозидазы» (в частности, на различную топографию участков связывания целлобиозы и *p*-нитрофенилглюкозида).

Еще одним свидетельством различной природы «арил-β-глюкозидазы», целлобиозы и эндоглюканазы может служить различная кинетика инактивации этих ферментов при повышенных температурах (рис. 4). Падение активности данных препаратов вызывается, видимо, несколькими факторами, в основном термоинактивацией и деградацией кислыми протеиназами. Последние были недавно обнаружены в коммерческих целлюлазных препаратах [24]. Во всяком случае, независимо от механизма инактивации различный ход соответствующих кривых указывает на то, что «арил-β-глюкозидазная» активность препаратов из *Asp. niger*, *T. lig-*



Таблица 3

Ингибирование глюконо- $\delta$ -лактоном «арил- $\beta$ -глюкозидазной» активности целлюлазных препаратов из различных источников (20° С, рН 4,5)

Источник	Тип ингибирования	$K_i \cdot 10^5$ , М
<i>T. longibrachiatum</i> *	Конкурентный	4 $\pm$ 2
<i>T. reesei</i>	»	3 $\pm$ 1
<i>Asp. foetidus</i> <sup>2*</sup>	»	60 $\pm$ 10
<i>T. lignorum</i> <sup>3*</sup>	Неконкурентный	2,0 $\pm$ 0,5

\* Технический препарат Целлобронин ГЗХ [1].

<sup>2\*</sup> Технический препарат Пектофоегидин ГЗХ [1].

<sup>3\*</sup> Технический препарат Целлолигнорин П10Х [1].

Таблица 4

Влияние количества целлюлазного препарата из *G. candidum*, нанесенного на колонку с микрокристаллической целлюлозой (рН 4,2; 25° С), на количество адсорбированной «арил- $\beta$ -глюкозидазы» и на стационарную концентрацию глюкозы на выходе из колонки

Целлюлазный препарат, мг	Адсорбированная «арил- $\beta$ -глюкозидаза», %	[Glc] $\cdot 10^4$ , М
5	100	1,1
12,5	80	2,7
25	50	5,2

*norum*, *G. candidum*, а также Rapidase не может быть проявлением активности эндоглюканазы и целлобиазы из этих источников.

Помимо приведенных выше данных нами было получено еще одно доказательство, что «арил- $\beta$ -глюкозидазная» активность не может быть отнесена к эндоглюканазе или экзоглюкозидазе целлюлазных комплексов. Оно основано на факте, что глюконо- $\delta$ -лактон эффективно подавляет «арил- $\beta$ -глюкозидазную» активность из различных источников (табл. 3), в то время как практически не действует на эндоглюканазу и экзоглюкозидазу [25, 26]. Как видно из табл. 3, константы ингибирования глюконо- $\delta$ -лактоном различных «арил- $\beta$ -глюкозидаз» изменяются от  $2 \cdot 10^{-5}$  до  $6 \cdot 10^{-4}$  М. В то же время глюконо- $\delta$ -лактон практически не влияет на активность эндоглюканазы (регистрируемую по уменьшению вязкости растворов карбоксиметилцеллюлозы) и экзоглюкозидазы (регистрируемую по образованию глюкозы из растворимых и нерастворимых полимерных производных целлюлозы за вычетом действия целлобиазы) вплоть до концентрации  $3 \cdot 10^{-2}$  М [25]. Более того, глюконо- $\delta$ -лактон не влияет также на скорость образования целлобиазы при действии различных целлюлазных препаратов на карбоксиметилцеллюлозу, фильтровальную бумагу и микрокристаллическую целлюлозу, что свидетельствует об отсутствии ингибирующего эффекта и на целлобигидролазу [25].

В принципе нельзя полностью отвергать предположение, что «арил- $\beta$ -глюкозидаза» все-таки является разновидностью экзоглюкозидазы, хотя и ингибируется глюконо- $\delta$ -лактоном. Для проверки этого предположения нами была изучена способность «арил- $\beta$ -глюкозидазы» адсорбироваться на нерастворимой целлюлозе и образовывать из нее непосредственно глюкозу. С использованием проточного реактора колоночного типа, содержащего микрокристаллическую целлюлозу и уравновешенного натрий-ацетатным буфером при рН 4,2 и 25° С, анализировали состав элюента на

содержание белка и «арил-β-глюкозидазы» после прохождения через колонку целлюлазного препарата из *G. candidum*. При нанесении на колонку 5 мг ферментного препарата и элюировании тем же буфером было показано, что пик на выходе содержит до 70% от нанесенного белка, но практически не содержит «арил-β-глюкозидазы». Заметной десорбции ее не наблюдается даже при длительном пропускании буферного раствора с рН 4,2. Десорбцию не удавалось вызвать также пропусканием через колонку ингибиторов «арил-β-глюкозидазы» — целлобиозы ( $2 \cdot 10^{-3}$  М) и глюкозы (0,1 М). Почти количественного (90–100%) освобождения этого фермента из комплекса с целлюлозой удалось добиться только после смещения рН элюента в нейтральную область (рН 7–8). Таким образом, «арил-β-глюкозидаза» адсорбируется на целлюлозе в рН-оптимальной активности практически необратимо.

В табл. 4 приведены данные, показывающие количество необратимо адсорбированной «арил-β-глюкозидазы», а также стационарный уровень образующейся глюкозы в зависимости от количества нанесенного на колонку ферментного препарата. Видно, что при увеличении количества нанесенного ферментного препарата в 5 раз пропорционально увеличивается и скорость образования глюкозы, тогда как количество адсорбированной «арил-β-глюкозидазы» возрастает лишь в 2,5 раза. Отсутствие корреляции показывает, что «арил-β-глюкозидаза» не образует в заметной степени глюкозу непосредственно из целлюлозы. Наконец, полная десорбция «арил-β-глюкозидазы» с колонки при элюировании буферным раствором с рН 7,0 не приводит к полному прекращению образования глюкозы на выходе.

Таким образом, данные, полученные с использованием корреляций между активностями различных компонентов целлюлазных комплексов из различных источников, а также результаты изучения кинетики гидролиза растворимых и нерастворимых субстратов, ингибирования соответствующих реакций глюкозой, целлобиозой и глюконо-δ-лактоном, изучения зависимостей ферментативных реакций от рН, инактивации ферментов при повышенных температурах и кинетики ультразвуковой инактивации позволяют заключить, что «арил-β-глюкозидазная» активность во многих случаях не имеет прямого отношения к целлюлолитическим ферментам и определение этой активности с использованием арил-глюкозидов пока не является информативным для характеристики целлюлазных комплексов.

*Кинетические и сорбционные свойства целлобиаз из различных источников.* В литературе имеются многочисленные указания на то, что в состав целлюлазных комплексов входит, как правило, не одна, а несколько целлобиаз, различающихся молекулярным весом, изоэлектрическими свойствами, субстратной специфичностью и т. д. Отмечается также, что целлобиазы из различных источников существенно отличаются друг от друга. Из полученных в настоящей работе данных следует, что различия в физико-химических свойствах целлобиаз различного происхождения проявляются по отношению к целлюлозе в первую очередь в их адсорбционной способности (табл. 5). В то же время способность связывать специфический субстрат, целлобиозу, весьма близка для целлобиаз из различных источников (табл. 6), и значения констант Михаэлиса для большинства ферментативных препаратов лежат в диапазоне  $(2 \pm 0,5) \cdot 10^{-3}$  М. Более того, из табл. 6 следует, что в ходе очистки целлюлазных комплексов значения констант Михаэлиса для гидролиза целлобиозы остаются практически постоянными. Таким образом, несмотря на различия в физико-химических свойствах целлобиаз (как правило, выделенных из состава целлюлазных комплексов с помощью биохимических методов), они могут считаться для большинства случаев кинетически эквивалентными. Этот факт должен в значительной степени упростить кинетическое описание ферментативного гидролиза целлюлозы под действием целлюлазных комплексов различного происхождения.

## Адсорбция целлюлолитических ферментов на нерастворимой целлюлозе

Субстрат (носитель)	Источник ферментного препарата	Адсорбированные ферменты, % от содержания в исходном препарате		
		Эндоглюканаза	Целлобиаза	«Арил-β-глюкозидаза»
Микрокристаллическая целлюлоза	<i>T. lignorum</i> I *	97	—	40
	<i>G. candidum</i>	73	85	83
	<i>Asp. niger</i>	13	35	5
Бумага	Rapidase *	4	—	30
	<i>T. lignorum</i> I *	64	—	99
	<i>G. candidum</i>	30	43	41
	Rapidase *	8	—	10

\* Препарат практически неактивен по отношению к целлобиазе.

Таблица 6

## Кинетические параметры ферментативного гидролиза целлобиозы под действием целлюлазных комплексов из различных источников

Препарат *	$K_m$ , $10^3$ , М	$V \cdot 10^6$ , М целлобиозы мин <sup>-1</sup> препарата	Препарат *	$K_m$ , $10^3$ , М	$V \cdot 10^6$ , М целлобиозы мин <sup>-1</sup> препарата
II	1,3	7	II	1,8	70
III	1,3	12	<i>Asp. niger</i> I	2,0	35
IV	1,2	40	II	2,5	1200
I (V)	1,3	550	<i>Asp. foetidus</i> I	2,0	75
<i>G. candidum</i> I	2,5	5	II	2,0	10 000
II	2,0	45	III	1,8	9000
III	2,5	180	<i>Asp. terreus</i>	3,8	25
IV	2,8	270	<i>T. viride</i>	2,0	23
V	2,4	2950	<i>T. longibrachiatum</i>	1,5	10
<i>T. koningii</i> I	1,0	6,5			
II	1,8	20			

\* I—V — препараты различной степени очистки или производства различных фирм.

Таблица 7

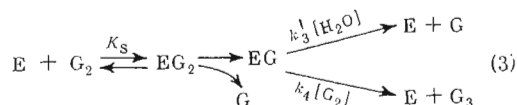
## Кинетические параметры \* ферментативного гидролиза растворимой СМ-целлюлозы под действием целлюлазных препаратов из различных источников

Источник	$K_m$ , г/л	$V \cdot 10^6$ , М · мин <sup>-1</sup> · г <sup>-1</sup>	Источник	$K_m$ , г/л	$V \cdot 10^6$ , М · мин <sup>-1</sup> · г <sup>-1</sup>
<i>T. lignorum</i> I	0,3	50	<i>Asp. terreus</i>	0,6	370
<i>G. candidum</i>	0,4	260	Rapidase	0,7	1700
<i>Asp. niger</i>	0,5	330			

\* Измерены с помощью вискозиметрического метода (см. «Экспериментальную часть»).

Известно, что β-глюкозидазы способны катализировать не только гидролиз, но и трансглюкозилирование. В связи с этим можно представить два простейших механизма образования глюкозы при гидролизе целлобиозы под действием целлобиазы. Первый, обычный, состоит в образовании двух молекул глюкозы при гидролизе целлобиозы (верхний путь на схеме 3); второй — в образовании одной молекулы глюкозы и переносе второго глю-

козильного остатка на другую молекулу субстрата с образованием триса-харида



Здесь G — глюкоза, G<sub>2</sub> — целлобиоза, выступающая в роли субстрата или дополнительного нуклеофильного агента в реакции с гликозил-ферментом E,  $k_3 = k_3' [H_2O]$ . Анализ схемы 3 приводит к следующему выражению [27, 28] для начальной скорости образования глюкозы:

$$v = \frac{(2k_3 + k_4 [G_2]) [E]_0 [G_2]}{(K_s + [G_2]) \frac{k_3 + k_4 [G_2]}{k_2} + [G_2]} \quad (4)$$

Из выражения 4 видно, что в общем случае (при сравнимых скоростях гидролиза и трансгликозилирования) зависимость начальной скорости образования глюкозы от концентрации субстрата должна иметь вид кривой с максимумом, формально аналогичный ингибированию избытком субстрата. Однако экспериментальные данные показывают, что кинетика образования глюкозы из целлобиозы под действием целлюлазных комплексов из различных источников подчиняется обычному уравнению Михаэлиса — Ментен (табл. 6). Таким образом, на практике реализуется один из двух крайних случаев (см. уравнение 4):

а) скорость трансгликозилирования очень мала по сравнению со скоростью гидролиза ( $k_4 [G_2] \ll k_3$ );

б) скорость трансгликозилирования велика по сравнению со скоростью гидролиза ( $k_4 [G_2] \gg k_3$ ).

В первом случае основным продуктом ферментативного гидролиза целлобиозы будет глюкоза и концентрация общих восстанавливающих сахаров в ходе реакции должна удвоиться по сравнению с исходным субстратом. Во втором случае основным продуктом будет целлотриоза, концентрация восстанавливающих сахаров в ходе реакции не должна меняться (как результат превращения двух молекул целлобиозы в глюкозу и целлотриозу) и концентрация глюкозы к концу реакции составила бы только половину от исходной концентрации субстрата.

Анализ полной кинетической кривой накопления продуктов ферментативного гидролиза целлобиозы (рис. 5) показал, что к концу реакции концентрация восстанавливающих сахаров удвоилась и сравнялась с концентрацией глюкозы. Таким образом, глюкоза образуется в результате гидролиза целлобиозы, а не трансгликозилирования (случай а, см. выше), и целлобиоза в данном случае практически не проявляет трансгликозилирующей способности в исследованном интервале концентраций целлобиозы (вплоть до  $4 \cdot 10^{-3}$  М). Именно основываясь на приведенных здесь данных, для определения активности целлобиаз в предыдущей статье [1] была рекомендована концентрация целлобиозы  $2 \cdot 10^{-3}$  М. Во-первых, при данной концентрации целлобиозы не наблюдается трансгликозилирующего действия целлобиаз. Во-вторых, поскольку данная величина близка к значениям констант Михаэлиса для многих целлобиаз (табл. 6), это дает возможность быстро оценить максимальную скорость (V) ферментных препаратов как величину, вдвое превышающую их активность.

*Кинетические и сорбционные свойства эндоглюканаз из различных источников.* Из табл. 5 видно, что способность эндоглюканаз адсорбироваться на нерастворимой целлюлозе чрезвычайно варьируется для ферментов различного происхождения. Поскольку именно нерастворимая целлюлоза является первичным субстратом для эндоглюканаз, обнаруженные нами различия в адсорбционной способности эндоглюканаз и их кинетические

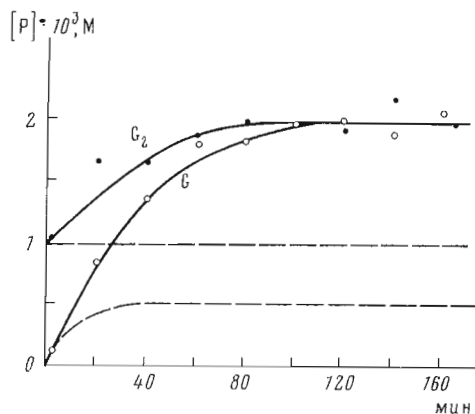


Рис. 5. Кинетика образования глюкозы (G) и общих восстанавливающих сахаров ( $G_2$ ) при гидролизе целлюлозы (1·10<sup>-3</sup> М) под действием целлюлазного препарата из *G. candidum* (0,5 г/л) (25° С, 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 4,2). Пунктиром показано, как изменялись бы концентрации глюкозы (нижняя кривая) и восстанавливающих сахаров (верхняя кривая) при переносе глюкозильного остатка на субстрат (нижний путь на схеме 3)

следствия очень важны для понимания механизма ферментативного гидролиза целлюлозы и будут предметом дальнейшего изучения и обсуждения в последующих статьях данного цикла. Вместе с тем способность связываться с растворимым субстратом, карбоксиметилцеллюлозой, достаточно близка для эндоглюканаз из различных источников (табл. 1), и значения констант Михаэлиса изученных препаратов лежат в интервале  $0,5 \pm 0,2$  г/л. Во всяком случае, взаимодействие активных центров с карбоксиметилцеллюлозой характеризуется близким сродством для всех изученных эндоглюканаз в отличие от их адсорбируемости на нерастворимых субстратах. Это позволяет предположить, что адсорбция данных ферментов на нерастворимой целлюлозе происходит в основном за счет других участков связывания гликопротеиновой молекулы (возможно, за счет их углеводных остатков), а не активного центра.

### Экспериментальная часть

*Источники и характеристики* используемых целлюлазных препаратов, а также субстратов целлюлолитических ферментов и методики определения активности компонентов целлюлазного комплекса приведены в предыдущей работе [1]. Препараты, источник которых обозначен в настоящей статье как *T. lignorum* I, получены глубинным культивированием (штамм ОМ 534-6) в ВНИИ прикладной энзимологии ЛитССР, Институте микробиологии АН БССР, Институте микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР и на Олайпском заводе химических реактивов. Препараты из *T. lignorum* (без индекса или с другими индексами, кроме I) получены поверхностным культивированием (штамм 6с) во ВНИИбиотехника или на биохимическом заводе [2]. Глюконо-δ-лактоп синтезирован по методу [29], температура плавления 151,5° С. В качестве нерастворимых субстратов целлюлаз использовали хроматографическую бумагу Whatman № 1 (Англия) и микрокристаллическую целлюлозу (Chemapol, ЧССР).

Все опыты по определению целлюлолитических активностей с использованием растворимых субстратов проводили в 0,05 М натрий-ацетатном буфере, рН 4,5, в присутствии 0,1 М NaCl при 40° С. Ферментативные активности измеряли в международных единицах в расчете на 1 г фермент-

ного препарата. При этом за единицу эндоглюканазной активности принимали условное количество фермента, которое расщепляет неупорядоченно 1 мкмоль глюкозидных связей за 1 мин в начальный период реакции с растворимой СМ-целлюлозой (0,2–0,4%). Единица целлобиазной активности соответствует скорости расщепления 1 мкмоль целлобиозы (или образования из нее 2 мкмоль глюкозы) за 1 мин при концентрации целлобиозы  $2 \cdot 10^{-3}$  М. За единицу «арил- $\beta$ -глюкозидазной» активности принимали скорость образования 1 мкмоль *p*-нитрофенола за 1 мин при инкубации ферментного препарата с  $5 \cdot 10^{-4}$  М *p*-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозидом при 25° С. Сводная таблица активностей 30 используемых целлолазных препаратов по отношению к различным субстратам дана в предыдущей статье [1].

Изучение ферментативного гидролиза *p*-нитрофенилглюкозида проводили с помощью непрерывной спектрофотометрической регистрации *p*-нитрофенола, образующегося в качестве продукта реакции, при 346 нм. Поскольку спектр оптического поглощения *p*-нитрофенола в условиях реакции сдвинут в более длинноволновую область по сравнению с исходным субстратом [30], образование *p*-нитрофенола можно регистрировать непосредственно в реакционной системе. Длина волны 346 нм соответствует изобестической точке перехода *p*-нитрофенил-*p*-нитрофенолят-ион, и ее поэтому удобно использовать при изучении зависимости скорости гидролиза *p*-нитрофенилглюкозида от рН. Разностный коэффициент экстинкции определяли по поглощению  $10^{-5}$  М раствора *p*-нитрофенилглюкозида до и после его ферментативного гидролиза. При этом вводили поправку на поглощение фермента и разбавление раствора субстрата при внесении ферментного препарата. Полученное значение разностного коэффициента экстинкции составило  $2,35 \cdot 10^3$  М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>.

Растворы ферментных препаратов готовили перемешиванием определенной навески препарата в 0,05 М натрий-ацетатном буфере (с добавкой 0,1 М NaCl), рН 4,5, в течение 15–20 мин. Проверка показала, что для времени более 20 мин ферментативная активность раствора не зависела от продолжительности перемешивания. Нерастворившийся осадок отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 8000 об/мин. Аналогично готовили растворы ферментных препаратов и для исследования гидролиза других субстратов. Определение кинетических параметров гидролиза *p*-нитрофенилглюкозида проводили со следующей концентрацией ферментных препаратов (г/л): из *Asp. niger* (Sigma) — 0,12, *T. lignorum* — 7,3, *G. candidum* — 0,49, *Asp. terreus* — 0,16, из Rapidase — 15. Концентрации всех использованных ферментных препаратов находились в линейной области зависимости скорости ферментативных реакций от концентрации препаратов.

Концентрации *p*-нитрофенилглюкозида при проведении кинетических исследований варьировали в области  $5 \cdot 10^{-5}$ – $10^{-3}$  М. Запасной раствор субстрата ( $10^{-2}$  М) готовили по навеске (М) в 0,05 М натрий-ацетатном буфере, рН 4,5, с добавлением 0,1 М раствора NaCl. В данных условиях спонтанный гидролиз субстрата проходил медленно, поэтому растворы использовали в течение 2 сут. Концентрацию субстрата в растворе контролировали спектрофотометрически по поглощению при 300 нм с использованием коэффициента экстинкции *p*-нитрофенилглюкозида  $9,5 \cdot 10^3$  М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>.

Типичный кинетический эксперимент проводили с помощью регистрирующего спектрофотометра Pye Unicam SP 1800 следующим образом. В 1-см кварцевую кювету объемом 1 мл, термостатируемую при 40° С, вносили определенный объем буфера и запасного раствора *p*-нитрофенилглюкозида до необходимой концентрации. Проводили регистрацию скорости фонового изменения поглощения при 346 нм, добавляли раствор ферментного препарата (не более 0,1 мл), перемешивали 5–7 с и регистрировали начальную скорость ферментативного гидролиза. При изучении влияния

глюкозы, целлобиозы и глюконо- $\delta$ -лактона на «арил- $\beta$ -глюкозидазную» активность их растворы добавляли перед введением раствора целлюлазного препарата.

*Изучение зависимости скорости гидролиза *n*-нитрофенилглюкозида от рН* (как и целлобиозы) проводили в области рН 3–7 с использованием 0,05 М натрий-ацетатно-фосфатного буфера (содержащего 0,1 М NaCl). Кинетические параметры гидролиза *n*-нитрофенилглюкозида при различных значениях рН определяли с помощью скоростного 16-канального анализатора GEMSAEC (Electronucleonics, США) при 346 нм. Полученные данные изменения поглощения во времени в кювете поступали в компьютер PDP/8E, обрабатывались по составленной программе и соответствующие значения начальных скоростей ферментативной реакции выводились на печать. Для учета «мертвого» времени реакции (для GEMSAEC оно составляет 26 с) прибор проводит учет протекания реакции до начала регистрации по специальной программе, основываясь на первых измерениях оптической плотности раствора и величине коэффициента экстинкции продукта реакции. Обработку экспериментальных данных проводили по программам, составленным сотрудником кафедры химической энзимологии МГУ А. С. Белоусовым.

*Изучение ферментативного гидролиза целлобиозы* проводили с помощью селективной регистрации глюкозы глюкозооксидазно-пероксидазным методом [1, 31]. Концентрацию целлобиозы варьировали в интервале  $3 \cdot 10^{-5}$ – $4 \cdot 10^{-3}$  М. Запасной раствор целлобиозы ( $2 \cdot 10^{-2}$  М) готовили по навеске в 0,05 М натрий-ацетатном буфере (0,1 М NaCl), рН 4,5. Раствор субстрата ежедневно контролировали на отсутствие глюкозы с помощью глюкозооксидазно-пероксидазного метода.

Определение кинетических параметров гидролиза целлобиозы проводили в 0,05 М натрий-ацетатном буфере (0,1 М NaCl), рН 4,5, при 40° С. Типичный кинетический эксперимент проводили следующим образом. В термостатируемый при 40° С сосуд (3–5 мл) вносили буферный раствор, запасной раствор субстрата и после перемешивания добавляли раствор ферментного препарата. Общий объем реакционной смеси составлял 1,5–2 мл. Реакцию проводили при перемешивании на магнитной мешалке. Сразу же после внесения фермента отмечали время начала реакции, отбирали нулевую и последующие пробы объемом 0,1 мл и анализировали их на содержание глюкозы. Так как реагент на глюкозу имеет рН 7, то при внесении 0,1 мл пробы в 0,9 мл реагента [1] гидролиз целлобиозы практически прекращался. Определение каждого значения начальной скорости проводили на основании результатов анализа 3–4 проб, соответствующих разным моментам реакции на глубине превращения, не превышающей 20%. Спонтанный гидролиз целлобиозы в отсутствие фермента за время проведения кинетических экспериментов практически не наблюдался.

*Ультразвуковую инактивацию целлюлазного препарата из *G. candidum** (очищенного методами гель-хроматографии [20]) проводили с использованием генератора УТС-1М с частотой 880 кГц с плавным регулированием интенсивности. Рабочая интенсивность 2 Вт/см<sup>2</sup> (порог кавитации в наших условиях соответствовал приблизительно 1 Вт/см<sup>2</sup>). Озвучивание водных растворов целлюлазного препарата (в концентрации 0,5 г/л, буферный раствор, содержащий 0,01 М CH<sub>3</sub>COONa, 0,01 М H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) проводили в кювете объемом 30 мл, предварительно термостатируемой при 36° С. Через 5–10 мин после начала озвучивания температура раствора повышалась до 40° С и в течение всего последующего эксперимента оставалась постоянной. Через определенные промежутки времени (10–30 мин) из ячейки отбирали по 1 мл раствора ферментного препарата и определяли его относительную активность к субстратам (целлобиоза, *n*-нитрофенилглюкозид и карбоксиметилцеллюлоза) при рН 4,5 и температуре 25° С.

Озвучивание ферментного препарата проводили в отсутствие субстратов в одинаковых условиях во всем исследуемом диапазоне рН (1,5–9,2).

Во всех случаях кинетика ультразвуковой инактивации подчинялась первому порядку.

При регистрации образующейся *D*-глюкозы в ходе ферментативного гидролиза целлобиозы и карбоксиметилцеллюлозы (глюкооксидазно-пероксидазным методом) делали поправку на дополнительное образование перекиси водорода в растворе в ходе озвучивания. Для этого в 1-см кварцевую клетку помещали 2,15 мл глюкозооксидазно-пероксидазного реагента [1], добавляли 0,1 мл *o*-дианизидина, вносили 0,25 мл раствора ферментного препарата и в отсутствие субстрата регистрировали начальную скорость образования окрашенных продуктов окисления *o*-дианизидина [1].

Инактивацию целлюлазных препаратов при 50 и 67°С проводили в термостатированных ячейках с пришлифованными пробками объемом 10–50 мл. Препараты инкубировали в 0,05 М натрий-ацетатном буфере (0,1 М NaCl), pH 4,5. В начальный момент инактивации и далее через определенные промежутки времени (см. рис. 4) отбирали пробы объемом 3–10 мл и в стандартных условиях (см. выше) определяли остаточную эндоглюканазную, целлобиазную и «арил- $\beta$ -глюкозидазную» активности. Исходные концентрации целлюлазных препаратов подбирали так, чтобы соблюдалась линейная зависимость целлюлолитических активностей от концентраций препаратов.

Определение кинетических параметров гидролиза растворимой карбоксиметилцеллюлозы проводили вискозиметрическим методом [1, 32], используя начальную концентрацию субстрата в диапазоне 0,3–4 г/л. Запасные растворы карбоксиметилцеллюлозы (15 г/л) готовили в 0,05 М натрий-ацетатном буфере, pH 4,5, с добавлением 0,1 М NaCl. Субстрат растворяли с помощью интенсивного перемешивания на магнитной мешалке при нагревании (50–60°С) в течение 1 ч. Нерастворившийся осадок удаляли центрифугированием при 8000 об/мин в течение 45 мин. Полученный прозрачный раствор использовали для работы в течение 2 сут. Проверка показала, что за этот срок не происходит заметного снижения вязкости запасных растворов карбоксиметилцеллюлозы. Истинную весовую концентрацию растворов субстрата определяли путем лиофильного высушивания 2 мл запасного раствора карбоксиметилцеллюлозы и сравнения веса сухого остатка с весом остатка, полученного при высушивании 2 мл буферного раствора.

Пропорциональность между концентрацией ферментного препарата и начальной скоростью уменьшения вязкости (методика регистрации дана в предыдущей работе [1]) наблюдалась по меньшей мере в интервалах  $10^{-4}$ – $2 \cdot 10^{-3}$  г/л препарата Rapidase,  $10^{-2}$ – $1,5 \cdot 10^{-2}$  г/л препарата из *Asp. niger* (Sigma) и *Asp. terreus*,  $2 \cdot 10^{-3}$ – $4 \cdot 10^{-2}$  г/л препаратов из *G. candidum* и *T. lignorum* I при концентрации СМ-целлюлозы 2 г/л. Для определения кинетических параметров ферментативного гидролиза использовали следующие концентрации растворов ферментных препаратов (г/л):  $6 \cdot 10^{-4}$ – для Rapidase,  $4 \cdot 10^{-3}$ – для *G. candidum*, *Asp. niger* и *Asp. terreus*,  $2 \cdot 10^{-2}$ – для *T. lignorum* I.

Адсорбцию целлюлолитических ферментов на нерастворимой целлюлозе (измельченная хроматографическая бумага или микрокристаллическая целлюлоза) изучали с использованием проточной стеклянной колонки объемом 7 мл, термостатируемой при 25°С, соединенной с перистальтическим насосом фирмы ЛКВ (Швеция) с выходом на автоматический коллектор фракций той же фирмы. В колонку помещали 2,5 г нерастворимой целлюлозы, предварительно набухшей в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, pH 4,2. На колонку наносили 0,2–0,5 мл концентрированного раствора изучаемого целлюлазного препарата, что соответствовало навеске его 10–125 мг, и проводили элюирование тем же буфером. Скорость пропускания раствора через колонку составляла 0,18 мл/мин, объем собираемых фракций на выходе – 2,1 мл. Во фракциях анализировали эн-



догляканазную, целлюбиазную и «арил-β-глюкозидазную» активности. Долю адсорбированного компонента вычисляли по разности между нанесенной на колонку и элюированной активностями.

После прекращения выхода активностей целлюлолитических ферментов с колонки и установления стационарной скорости выхода глюкозы и восстанавливающих сахаров (продуктов ферментативного гидролиза носителя) через колонку пропускали 0,01 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,0. При этом происходила практически полная десорбция и элюирование из колонки «арил-β-глюкозидазы» и целлюбиазы всех изученных препаратов (табл. 5), а также эндогляканазы из *Asp. niger* и Rapidase, что указывает на отсутствие инактивации целлюлолитических ферментов, в условиях опыта. Подробное обсуждение результатов экспериментов по адсорбции ферментов будет дано в последующих статьях данного цикла исследований.

*Используемые уравнения и преобразования.* Анализ зависимости скорости ферментативного гидролиза целлюбиозы и *n*-нитрофенилглюкозида от рН проводили в рамках схемы 1 с помощью известных кинетических методов (см. [28], гл. 10). Значения констант диссоциации ионогенных групп свободного фермента ( $K_1$  и  $K_2$ ) определяли из зависимости константы скорости второго порядка  $V_{\text{наж}}/K_m(\text{наж})$  ферментативного гидролиза от рН согласно уравнению

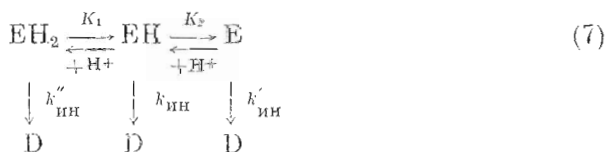
$$\frac{V_{\text{наж}}}{K_m(\text{наж})} = \frac{V/K_m}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[\text{H}^+]}} \quad (5)$$

Значения констант диссоциации групп фермент-субстратного комплекса ( $K'_1$  и  $K'_2$ ) определяли из зависимости максимальной скорости реакции от рН:

$$V_{\text{наж}} = \frac{V}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K'_1} + \frac{K'_2}{[\text{H}^+]}} \quad (6)$$

Расчеты проводили подбором значений констант ионизации и кинетических параметров реакции до оптимального согласования теоретической кривой (полученной с использованием уравнений 5 и 6) с экспериментальными данными вручную или с использованием компьютера PDP/8E (см. выше).

Анализ зависимости скоростей ультразвуковой инактивации целлюлозного препарата от рН проводили в рамках схемы



Здесь символы  $\text{EH}_2$ ,  $\text{EH}$  и  $\text{E}$  соответствуют состояниям ионизации определенных групп фермента, контролирующим его устойчивость по отношению к инактивации (с соответствующими константами скоростей инактивации первого порядка),  $K_1$  и  $K_2$  — константы диссоциации данных ионогенных групп фермента,  $\text{D}$  — необратимо инактивированный фермент.

Кинетическая обработка схемы 7 приводит к следующему выражению для эффективной константы скорости инактивации первого порядка:

$$k_{\text{ин}}(\text{эфф}) = \frac{k_{\text{ин}} + k'_{\text{ин}} \frac{K_2}{[\text{H}^+]} + k''_{\text{ин}} \frac{[\text{H}^+]}{K_1}}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[\text{H}^+]}} \quad (8)$$

Величины  $k_{ин}$  для различных ферментов определяли непосредственно из экспериментальных данных (они соответствуют уровню плато в нижней части колоколообразных кривых рис. 2). Значения  $K_1$  и  $K_2$  определяли раздельным анализом соответственно левой и правой ветвей рН-зависимостей на рис. 2, произвольно подбирая значения констант  $k'_{ин}$  и  $k''_{ин}$  вплоть до оптимального соответствия теоретических кривых экспериментальным данным. Результаты обработки показали, что все три профиля рН-зависимости описываются в рамках схемы 7 и соответствующие расчетные кривые приведены на рис. 2.

Величины констант Михаэлиса и максимальных скоростей реакции определяли линеаризацией экспериментальных данных в координатах Лайнуивера — Берка ([28], гл. 5). Отнесение типа ингибирования к конкурентному, неконкурентному или смешанному проводили согласно [28]. Формально-кинетический анализ смешанного ингибирования «арил-β-глюкозидазы» целлобиозой проводили в рамках схемы 2 с помощью следующего уравнения скорости реакции ([28], гл. 5):

$$v = \frac{V \frac{\alpha K_i + \beta [I]}{\alpha K_i + [I]} [S]_0}{\alpha K_m \frac{K_i + [I]}{\alpha K_i + [I]} + [S]_0} \quad (9)$$

Нетрудно показать, что эффективные значения константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции, найденные из анализа экспериментальных данных в координатах Лайнуивера — Берка (рис. 3а), могут быть использованы для определения величин  $\alpha$  и  $\beta$  с помощью следующих выражений:

$$\frac{1}{\frac{K_m(\text{каж})}{K_m} - 1} = \frac{\alpha}{\alpha - 1} \cdot \frac{K_i}{[I]} + \frac{1}{\alpha - 1},$$

$$1 - \frac{V_{\text{каж}}/K_m(\text{каж})}{V/K_m} = \frac{\alpha}{\alpha - \beta} \cdot \frac{K_i}{[I]} + \frac{\alpha}{\alpha - \beta}.$$

Линеаризация экспериментальных данных в рамках данных уравнений (рис. 3б и в) позволяет найти численные значения  $\alpha$  и  $\beta$ .

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Клесов А. А., Рабинович М. Л., Сивичин А. П., Чурилова Н. В., Григораш С. Ю. (1980) Биоорг. химия, 6, 1225—1242.
2. Номенклатура ферментов (Рекомендации Международного биохимического союза) (1979) изд. ВИНТИИ, Москва, стр. 147.
3. Jermyn M. A. (1955) Austral. J. Biol. Sci., 8, 541—602.
4. Youatt G. (1958) Austral. J. Biol. Sci., 11, 209—217.
5. Jermyn M. A. (1965) Austral. J. Biol. Sci., 18, 387—415.
6. Bucht B., Eriksson K.-E. (1969) Arch. Biochem. and Biophys., 129, 416—420.
7. Berghem L. E. R., Pettersson L. G. (1974) Eur. J. Biochem., 46, 295—305.
8. Hwang J.-T., Suzuki H. (1976) Arg. Biol. Chem., 40, 2169—2175.
9. Родионова Н. А., Бахтадзе Л. П., Мартинович Л. И., Румянцева Г. Н., Тиунова Н. А. (1977) Биохимия, 47, 43—49.
10. Maguire R. J. (1977) Can. J. Biochem., 55, 19—26.
11. Gong C.-S., Ladisch M. R., Tsao G. T. (1977) Biotechnol. and Bioeng., 19, 959—981.
12. Родионова Н. А., Бахтадзе Л. П., Мартинович Л. И., Румянцева Г. Н., Тиунова Н. А. (1978) II Всес. совещ. по ферментам микроорганизмов; октябрь 1978 г., Минск, тез. докл., ч. I, с. 76.
13. Herr D., Baumer F., Dellweg H. (1978) Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotechnol., 5, 29—36.
14. Shewale J. G., Sadana J. C. (1978) Can. J. Microbiol., 24, 1204—1216.
15. Nevalainen K. M. H., Palva E. T. (1978) Appl. Environment. Microbiol., 35, 11—16.
16. Deshpande V., Eriksson K.-E., Pettersson B. (1978) Eur. J. Biochem., 90, 191—198.
17. Umezurike G. M. (1979) Biochem. J., 177, 9—19.
18. Kleinschmidt T., Horst J. (1971) Hoppe-Seiler's Z. Physiol. Chem., 352, 603—610.

19. Legler G., Witassec F. (1974) Hoppe-Seiler's Z. Physiol. Chem., 335, 612-622.
20. Клесов А. А., Чурилова И. В. (1980) Биохимия, 45, 3-10.
21. Клибанов А. М., Мартинек К., Березин И. В. (1974) Биохимия, 39, 878-887.
22. Рабинович М. Л., Клесов А. А., Березин И. В. (1979) Докл. АН СССР, 246, 500-504.
23. Клесов А. А., Рабинович М. Л. (1978) в сб.: Инженерная энзимология и биоорганический катализ (Кретович В. Л., Березин И. В., ред.), Итоги науки и техники, сер. «Биологическая химия», т. 12, с. 49-91, изд. ВИНТИ.
24. Остославская В. И., Котлова Е. К., Степанов В. М., Руденская Г. Н., Баратова Л. А., Белянова Л. П. (1979) Биоорганич. химия, 5, 595-602.
25. Сипицын А. П., Клесов А. А. (1980) в кн.: Полиферментные системы, с. 126-145, изд. ВНИИПЭ, Вильнюс.
26. Reese E. T. (1969) in: Cellulases and their Application, Adv. Chem. Series, 95 (Gould R. F., ed.), Washington, D. C., pp. 26-33.
27. Бендецкий К. М., Яровенко В. Л. (1975) Докл. АН СССР, 224, 232-235.
28. Березин И. В., Клесов А. А. (1976) Практический курс химической и ферментативной кинетики, тл. 7, Изд. МГУ, М.
29. Isbell H. S., Pigman W. W. (1937) J. Res. Nat. Bur. Standards, 18, 147-150.
30. Рабинович М. Л. (1977) Канд. дис. «Кинетические аспекты действия карбогидраз», с. 64-66, М.
31. Березин И. В., Рабинович М. Л., Сипицын А. П. (1977) Биохимия, 42, 1631-1636.
32. Рабинович М. Л., Клесов А. А., Березин И. В. (1977) Биоорганич. химия, 3, 405-414.

Поступила в редакцию  
23.IX.1979

## ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CELLULOSE. II. CHARACTERISTICS OF INDIVIDUAL COMPONENTS OF CELLULASE COMPLEXES FROM VARIOUS SOURCES

KLYOSOV A. A., RABINOWITCH M. L., CHURILOVA I. V., SINITSYN A. P.,  
GRIGORASH S. Yu., TIKHONOVA T. V., MALINOVSKAYA L. M.

*M. V. Lomonosov State University, Department of Chemistry, Moscow*

A comparative study of kinetics and adsorption characteristics of endoglucanases, cellobiases and «aryl- $\beta$ -glucosidases» of cellulase preparations from various sources has been done. It was shown that the ability of these components to adsorb on insoluble cellulose (filter paper or Avicel) widely varies for various cellulase sources. On the other hand, the ability to bind soluble substrates (particularly, CM cellulose and cellobiose) is similar for the respective enzymes of different origin. In total, the data obtained using quantitative correlations between activities of different cellulase components, kinetics of enzymatic hydrolysis of soluble and insoluble substrates, inhibition of the reactions by glucose, cellobiose and glucono- $\delta$ -lactone, pH-profiles for the enzymatic hydrolysis, inactivation of the cellulase components at elevated temperatures, kinetics of inactivation of the components under the effect of ultrasonic cavitation, gave the ground to conclude that the «aryl- $\beta$ -glucosidase» activity is often not relevant directly to the cellulolytic enzymes. Thus, determination of this activity using aryl- $\beta$ -glucosides is not much productive so far for characterization of cellulase complexes.