



УДК 577.152.321*91'135

***n*-НИТРОФЕНИЛ- β -D-ЛАКТОЗИД — СУБСТРАТ
ДЛЯ НЕПРЕРЫВНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦЕЛЛОБИОГИДРОЛАЗЫ I
В ЦЕЛЛЮЛАЗНЫХ КОМПЛЕКСАХ**

**Рабинович М. Л., Мельник М. С., Новикова Т. В.,
Тихомиров Д. Ф., Галебаровская И. К.*, Щеглов А. А.*,
Клесов А. А.**

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

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

Хромогенный субстрат — *n*-нитрофенил- β -D-лактозид (NPL) предложен для определения экзоцеллобиогидролаз в целлюлазных комплексах. Изучен его гидролиз индивидуальными целлобиогидролазами I и II (рI 4,2 и 5,9) *Trichoderma reesei*, очищенными эндоглюканазами I и II (рI 4,7–5,3) *T. reesei* и β -глюкозидазой *Aspergillus awamori*, а также неочищенными и частично очищенными ферментными препаратами *T. reesei*, *Geotrichum candidum*, *A. foetidus*, *A. niger* и *Muceliophthora thermophila*. Целлобиогидролаза I *T. reesei* и ее множественные формы (рI 3,8–4,0) расщепляют NPL с оптимумом рН 4,3–4,7 (максимальная удельная активность 0,06 мкмоль/(мин·мг), K_m 0,5 мМ при 20°С); эндоглюканазы также расщепляют NPL, тогда как целлобиогидролаза II и очищенная β -глюкозидаза этот субстрат не гидролизуют. Целлобиоза в концентрации 0,08 г/л практически полностью подавляет действие целлобиогидролазы I, но не оказывает влияния на действие эндоглюканаз и β -глюкозидаз препаратов *T. reesei* и *A. foetidus*, тогда как β -глоконолактоп (0,175–0,2 г/л) подавляет действие препарата *A. foetidus*, но не влияет на активность эндоглюканаз и целлобиогидролазы I *T. reesei*. Исследовано влияние концентрации целлобиозы на степень ингибирования гидролиза NPL ферментными препаратами *T. reesei*, *G. candidum*, *A. niger*, *M. thermophila*. Полученные данные свидетельствуют о наличии в первых двух препаратах по крайней мере двух компонентов — одного с высоким сродством к целлобиозе ($K_1 \ll 0,1$ мМ, целлобиогидролаза I) и другого с более низким сродством (K_1 0,5–0,8 мМ), ингибирующегося не полностью. В препаратах *A. niger* и *M. thermophila* фермента, подобного целлобиогидролазе I, нет. Показано, что низкомолекулярные примеси, имеющиеся в культуральной жидкости *T. reesei* и удаляемые гель-фильтрацией, существенно ингибируют активность целлобиогидролазы I, определенную по NPL. На основании полученных данных предложен метод определения целлобиогидролазы I в целлюлазных комплексах.

Целлобиогидролаза (КФ 3.2.1.91), один из важнейших компонентов целлюлазного комплекса грибов, является в настоящее время объектом клонирования в дрожжах и бактериях [1, 2]. В этой связи возникает проблема отбора организмов-доноров, образующих целлобиогидролазы с повышенной термостабильностью и молекулярной активностью. Однако методы определения активности целлобиогидролаз в смеси с другими целлюлолитическими ферментами, в первую очередь с эндоглюканазами, разработаны недостаточно, так как эти ферменты образуют общий продукт, целлобиозу, и, кроме того, усиливают действие друг друга при деградации обычных целлюлозных субстратов.

В последние годы появились работы, в которых для определения целлобиогидролаз использована их способность гидролизовать хромо- или флуорогенные арил- β -лактозиды с образованием лактозы и ароматического спирта [3–7]. Такой подход представляется весьма перспективным, хотя и нуждается в серьезном изучении, поскольку используемые субстраты не являются специфическими для целлобиогидролазы и могут расщепляться другими ферментами, образуемыми грибом-продуцентом.

В данном сообщении спектрофотометрическим методом непрерывного слежения за гидролизом субстрата исследовано действие индивидуальных целлобиогидролаз, эндоглюканаз, β -глюкозидаз, а также частично очищенных ферментных препаратов на *n*-нитрофенил- β -D-лактозид (NPL) и

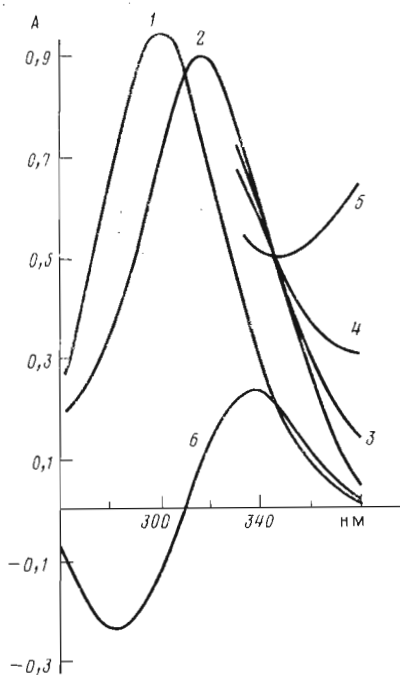


Рис. 1

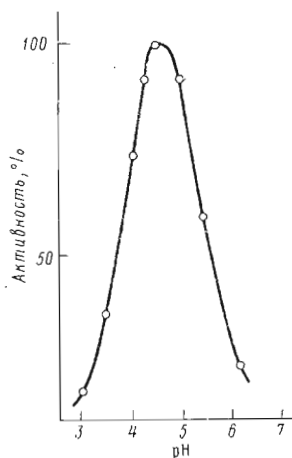


Рис. 3

Рис. 1. Спектры поглощения NPL (1) и продукта его гидролиза целлобиогидролазой I *p*-нитрофенола при рН 4,5 (2), 6 (3), 6,5 (4), 7 (5); разностный спектр при рН 4,5 (6). Концентрация хромогенов 0,1 мМ

Рис. 2. Кинетика гидролиза NPL (0,2 мМ; рН 4,5; 0,1 М ацетатный буфер, 20°С): 1 — целлобиогидролазой I *T. reesei* (0,25 мг/мл); 2 — целлобиогидролазой II *T. reesei* (0,46 мг/мл); 3 — препаратом *A. foetidus* (0,14 мг/мл); 4 — им же в присутствии глюкозо- δ -лактона (0,2 мг/мл)

Рис. 3. Зависимость от рН скорости гидролиза NPL (0,2 мМ) под действием целлобиогидролазы I (0,1 мг/мл); 0,2 М цитратный буфер, 20°С

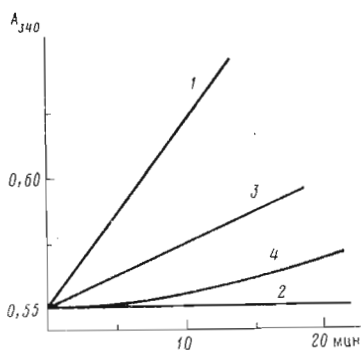


Рис. 2

предложен метод определения целлобиогидролазы I в целлюлазных комплексах различного происхождения.

В работах [3,4] в качестве субстрата целлобиогидролазы I был использован метилумбеллиферил- β -D-лактозид. Хотя этот субстрат может быть использован для непрерывной регистрации кинетики и позволяет добиться высокой чувствительности, он не является коммерчески доступным. Более удобен в этом отношении NPL, выпускаемый в последнее время фирмами ФРГ и США. В отличие от авторов работы [5], применивших для детекции образования нитрофенола из NPL стандартную процедуру (остановка реакции защелачиванием и фотометрирование нитрофенолята при 410 нм), мы регистрировали образование нитрофенола непосредственно в процессе реакции, что значительно повышает точность эксперимента.

На рис. 1 представлены спектры поглощения субстрата и хромогенного продукта при рН 4–7. Разностный спектр (кривая 6) имеет в кислой области минимум при 285 и максимум при 335 нм с изобестической точкой при 311 нм. Это означает, что при $\lambda < 311$ нм можно непрерывно регистрировать реакцию по уменьшению поглощения, а при $\lambda > 311$ нм — по его уве-

личению. Последнее предпочтительнее, так как в длинноволновой области белки не поглощают и относительно невелико собственное поглощение субстрата, т. е. можно работать при более высоких концентрациях NPL, чем при $\lambda < 311$ нм. Кроме того, при 346 нм наблюдается изобестическая точка перехода *n*-нитрофенол — *n*-нитрофенолят (рис. 1, кривые 3–5), что позволяет регистрировать в этой области кинетику реакции при различных значениях pH, не вводя поправку на различия в поглощении протонированной и депротонированной форм продукта.

В этой связи для регистрации кинетики была выбрана длина волны 340 нм, средняя между 335 и 346 нм. Разностный молярный коэффициент поглощения $\Delta \epsilon_{340}$ составляет $2,35 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Чувствительность метода позволяет работать при концентрациях NPL 0,1–0,2 мМ, т. е. в 10–20 раз меньших, чем в работе [5]. Расход субстрата на один эксперимент составил 0,05–0,1 мг (в 20–40 раз меньше, чем в [5]), а время реакции — 5–10 мин при 20°С (в работе [5] — 30 мин при 50°С). Этот же метод использовался и при регистрации гидролиза *n*-нитрофенил- β -*D*-глюкозида.

Выделенная нами из культуральной жидкости основная форма целлюбиогидролазы I *Trichoderma reesei* (р/ 4,2) [8] при гидролизе NPL имеет K_m 0,5 мМ и V 0,06 мкмоль/(мин·мг белка) (20°С), pH 4,5, что хорошо согласуется с данными, полученными с использованием метилумбеллиферил- β -*D*-лактозида [3]. В то же время индивидуальная целлюбиогидролаза II *T. reesei* (р/ 5,9), выделенная нами [8], практически не действует на NPL в этих условиях (рис. 2). Эти данные качественно согласуются с данными работы [5], в которой обнаружено в 8 раз более слабое действие целлюбиогидролазы II на NPL по сравнению с целлюбиогидролазой I. Отсутствие активности у целлюбиогидролазы II в наших экспериментах может объясняться более низкими использованными концентрациями субстрата, низкой температурой и более коротким временем реакции. Таким образом, в выбранных нами условиях NPL может использоваться для селективного определения целлюбиогидролазы I в присутствии целлюбиогидролазы II.

Отсутствие гидролиза NPL целлюбиогидролазой II согласуется с обнаруженным в работе [4] отсутствием у нее сродства к лактозному остатку.

На рис. 3 представлена зависимость от pH скорости гидролиза NPL под действием целлюбиогидролазы. Поскольку использованная при этом концентрация субстрата (0,2 мМ) меньше K_m (0,5 мМ), построенная зависимость от pH фактически соответствует зависимости от pH V/K_m , и из этих данных можно приблизительно оценить рK ионогенных групп свободного фермента, участвующих в гидролизе NPL [9]. Оптимум pH действия фермента составляет 4,4–4,7, а рK групп — 3,7 и 5,6.

Как полагают авторы [10] на основании частичной гомологии между последовательностью лизоцима фага T4 и целлюбиогидролазы I, в состав активного центра последней входят остатки Glu⁶⁵ и Asp⁷⁴. Поэтому можно предположить, что рK' 3,7 соответствует карбоксилу Asp⁷⁴, а рK'' 5,6 — карбоксилат-аниону Glu⁶⁵.

В работе [11] определены значения оптимума pH (5,2), а также рK' (3,8) и рK'' (6,5) целлюбиогидролазы *T. viride* при гидролизе α -целлюлозы. Полученные нами и автором [11] значения рK' совпадают, однако оптимум pH и рK'' при гидролизе синтетического субстрата смещены в кислую область. Одной из причин может быть то, что для расчета рK' и рK'' автором [11] использована зависимость v_0 при высоких концентрациях субстрата (а не V/K_m) от pH, и полученные значения рK могут характеризовать фермент-субстратный комплекс, а не свободный фермент [9].

Как следует из рис. 4, минорные формы целлюбиогидролазы I с р/ 3,8–4,0 также обладают активностью по отношению к NPL. Удельная активность различных форм фермента по гидролизу NPL примерно одинакова, что упрощает определение общего содержания целлюбиогидролазы I в ферментном препарате.

В работе [3], где впервые использовали в качестве субстрата арил- β -

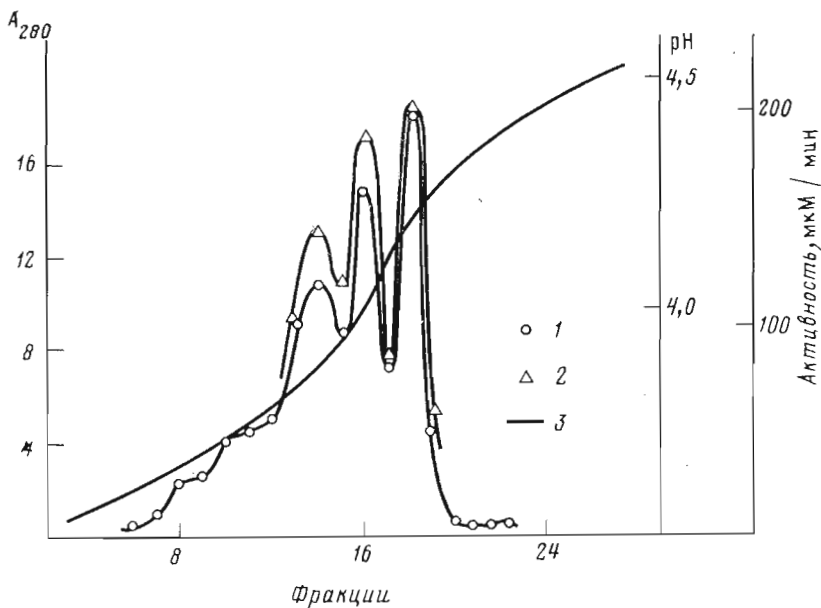


Рис. 4. Изоэлектрофограмма множественных форм целлюбиогидролазы I (рI 3,8–4,2). 1 – поглощение белка, 2 – активность по NPL. 3 – градиент рН. Эндогликоканазная активность всех форм – менее $5 \cdot 10^{-3}$ МЕ/мг белка

лактозид, не обнаружили действия эндогликоканаз *T. reesei* на этот субстрат. Однако авторы работы [5] показали, что NPL гидролизуется под действием эндогликоканаз *T. reesei* и *Sporotrichum pulverulentum*, хотя удельная активность эндогликоканаз по NPL в 3 раза меньше, чем у целлюбиогидролазы I.

Выделенная нами фракция эндогликоканаз I и II *T. reesei*, содержащая ферменты с рI 4,7 и 5,3 [8], также была активна по отношению к NPL, причем ее удельная активность по белку в 4 раза превышала активность целлюбиогидролазы (табл. 1).

Таблица 1

Активность ферментных препаратов по различным субстратам (нмоль расщепляемого субстрата или образующегося продукта в 1 мин на 1 мг белка)

Субстрат	Обесолоненная культуральная жидкость <i>T. reesei</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Aspergillus foetidus</i>	Целлюбиогидролаза I <i>T. reesei</i>	Эндогликоканазная фракция <i>T. reesei</i>	β -Глюкозидаза <i>Aspergillus awamori</i>
СМ-целлюлоза (вискозиметрия)	940	1450	540	<5	20 000	<5
Фильтровальная бумага (метод Манделъса)	125	260	132	55,7	900	Не опред.
<i>n</i> -Нитрофенил- β -D-глюкозид ($2 \cdot 10^{-4}$ М)	12,1	204	465	<0,5	<1	4300
<i>n</i> -Нитрофенил- β -D-лактозид (NPL; $2 \cdot 10^{-4}$ М)	3,6 *	10,7 *	8,8 **	15,8	62,4	<0,2
(<i>n</i> -Нитрофенил- β -D-лактозид) + целлюлоза (0,08 г/л)	1,75 *	6,6 *	8,3 **	<1	61	Не опред.
Целлюбиогидролазная активность по NPL	1,85	4,1 ***	$\leq 0,5$	15	<1	<0,2

* В присутствии глюконолактона (0,175 г/л).

** В отсутствие лактона; при добавлении лактона начальная скорость гидролиза равна нулю (см. рис. 2).

*** В действительности в 3 раза ниже (см. рис. 6–8 и пояснения к ним).

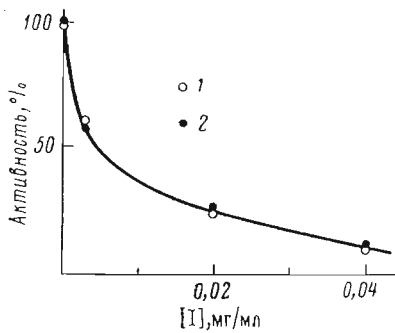


Рис. 5

Рис. 5. Остаточная активность целлюбиогидролазы I (0,25 мг/мл) по NPL (0,2 мМ) при различных концентрациях целлюбиозы (1) и метил-β-D-целлюбиозида (2), рН 4,5; 20°

Рис. 6. Влияние концентрации целлюбиозы на степень ингибирования гидролиза NPL (0,1 мМ, рН 4,5; 20° С): 1 — дважды обессоленной культуральной жидкостью *T. reesei* (0,32 МЕ/мл эндоглюказаны в реакционной смеси); 2 — *G. candidum* (0,36 МЕ/мл); 3 — *A. niger* (1,52 МЕ/мл); 4 — *M. thermophila* (0,53 МЕ/мл); 5 — однократно обессоленной культуральной жидкостью *T. reesei* (0,26 МЕ/мл); 6 — исходной культуральной жидкостью *T. reesei* (0,31 МЕ/мл)

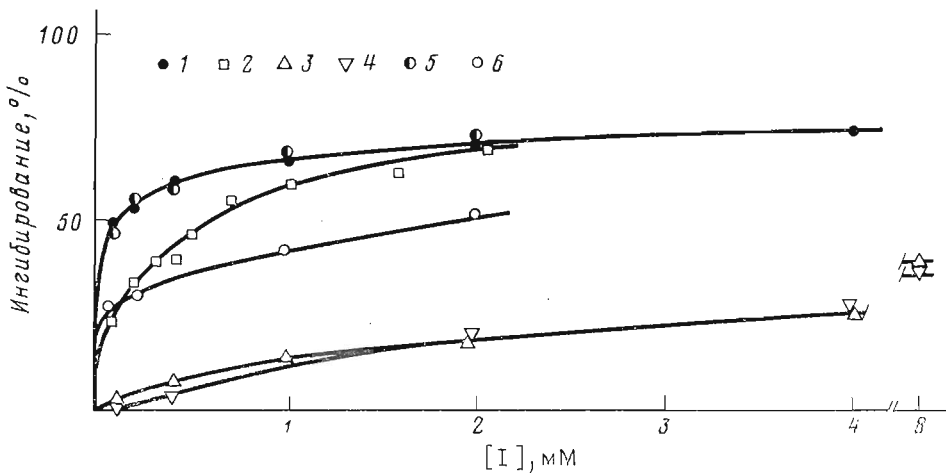


Рис. 6

Таким образом, для селективного определения целлюбиогидролазы I в целлюлазном комплексе необходимо элиминировать вклад эндоглюканазы. В работе [5] для этого предлагалось вводить поправку на количество эндоглюканазы, предварительно определяя удельную активность выделенной эндоглюканазы по NPL. Однако этот подход представляется слишком трудоемким для рутинных определений. Нами был разработан другой подход, основанный на избирательном ингибировании целлюбиогидролазы I в присутствии эндоглюканазы (ЭГ) и определении ее активности ($A_{цбг}$) по разности $A_{ЭГ+цбг} - A_{ЭГ}$.

Ранее [6, 7] нами было установлено, что в отличие от эндоглюканазы целлюбиогидролаза I сильно ингибируется целлюбиозой (K_i 6 мкМ) при действии на NPL. В данной работе в качестве селективных ингибиторов целлюбиогидролазы I были исследованы целлюбиоза и метил-β-целлюбиозид (рис. 5). Последний не был более эффективным ингибитором, чем целлюбиоза, поэтому в дальнейшем использовали только целлюбиозу.

Как показывает табл. 1, при концентрациях NPL, меньших K_{10} , целлюбиоза подавляет активность целлюбиогидролазы I на 95% уже при концентрации 0,08 г/л (0,23 мМ), в то время как активность эндоглюканазной фракции при этом снижается незначительно.

Таким образом, по крайней мере для препарата *T. reesei* возможно разделение активностей эндоглюканазы и целлюбиогидролазы I по NPL путем селективного ингибирования целлюбиогидролазы I целлюбиозой. Таблица 2 демонстрирует аддитивность действия эндоглюканазы и целлюбиогидролазы I по разности между суммарной активностью и активностью в присутствии 2,3 мМ целлюбиозы.

Аддитивность действия обоих ферментов на NPL и возможность селективного ингибирования целлюбиогидролазы I целлюбиозой является

Активности эндоглюканазы, целлюбиогидролазы I *T. reesei* и их смеси при гидролизе NPL (0,2 мМ) в отсутствие и в присутствии целлюбиозы

Состав смеси	Концентрация	Скорость гидролиза NPL, мкМ/мин
Целлюбиогидролаза I	0,2 мг/мл	3,2±0,2
Эндоглюканаза	0,025 »	1,6±0,1
Целлюбиогидролаза I	0,2 »	4,7±0,2
+ эндоглюканаза	0,025 »	
Целлюбиогидролаза I	0,2 »	
+ эндоглюканаза	0,025 »	
целлюбиоза	0,23 мМ	1,6±0,1

важным преимуществом данного метода перед использованием природных целлюлозных субстратов для определения целлюбиогидролазы I, поскольку при гидролизе таких субстратов может наблюдаться синергизм в действии обоих ферментов. Так, сравнивая результаты определения активности целлюлазных комплексов по фильтровальной бумаге (метод Мандельс, табл. 1), можно видеть, что они не коррелируют с содержанием эндоглюканазы, целлюбиогидролазы или β -глюкозидазы и, очевидно, зависят от присутствия всех компонентов целлюлазного комплекса. Это создает существенные трудности при определении выхода и степени очистки целлюбиогидролазы в ходе фракционирования целлюлазного препарата.

Напротив, применение NPL позволяет, например, оценить, что в культуральной жидкости *T. reesei* около половины активности приходится на целлюбиогидролазу I, а другая половина — на эндоглюканазу. Так как удельная активность целлюбиогидролазы I в 4 раза меньше, чем у эндоглюканазы, в культуральной жидкости должно содержаться по меньшей мере в 4 раза больше целлюбиогидролазы I, чем эндоглюканазы. Это согласуется с имеющимися в литературе данными о значительном преобладании целлюбиогидролазы I над эндоглюканазами у *T. reesei* [12].

Другой пример препарата, в котором имеется фермент, аналогично целлюбиогидролазе I *T. reesei* расщепляющий NPL и ингибирующий целлюбиозой в низких концентрациях, — целлюлазный комплекс *Geotrichum candidum* (табл. 1). Этот продуцент, как и *T. reesei*, образует систему ферментов, эффективно расщепляющую высокоупорядоченную целлюлозу [13].

Следует отдельно остановиться на возможном влиянии β -глюкозидаз на определение целлюбиогидролазы I данным методом. Индивидуальная β -глюкозидаза *Aspergillus awamori*, высокоактивная по отношению к *n*-нитрофенил- β -D-глюкозиду (Np-глюкозид), практически не действует на NPL (табл. 1). Это согласуется с данными [5], полученными для β -глюкозидазы *T. reesei*. Однако богатый гликозидазами препарат *A. foetidus* расщепляет NPL. Для выяснения роли β -глюкозидазы в гидролизе NPL ее активность по Np-глюкозиду (0,2 мМ) избирательно подавляли на $\geq 95\%$ δ -глюкополактоном в такой концентрации (0,175–0,2 мг/мл), которая снижала активность целлюбиогидролазы I или эндоглюканазы *T. reesei* по NPL не более чем на 5–10%.

Добавление глюконо- и галактонолактона в указанных концентрациях практически не влияло на определение целлюбиогидролазы I по NPL в препаратах *T. reesei* и *Geotrichum candidum*, что указывает на отсутствие влияния гликозидаз этих препаратов на определение целлюбиогидролазы I. Вместе с тем глюконо- δ -лактон сильно подавлял гидролиз NPL препаратом *A. foetidus*, причем на кинетической кривой в этом случае обнаруживался выраженный лаг-период (рис. 2). Это показывает, что образование нитрофенола из NPL под действием этого препарата происходит по меньшей мере в две стадии, на первой из которых, по-видимому, образу-

ются Np-глюкозид и галактоза и лишь на второй — нитрофенол. Отсутствие заметной начальной скорости гидролиза NPL в присутствии лактона, а также то, что гидролиз NPL почти не ингибируется целлобиозой (0,08 мг/мл, табл. 1), позволило заключить, что препарат *A. foetidus* не содержит целлобиогидролазы I.

Эти данные согласуются с тем, что препарат *A. foetidus* почти не расщепляет упорядоченную целлюлозу, в гидролизе которой ключевую роль играет целлобиогидролаза I [14].

Таким образом, применение лактонов, хотя и может снижать на 5—7% активность целлобиогидролазы I и эндоглюканазы по NPL, является желательным, так как позволяет обнаружить двухстадийность при гидролизе NPL гликозидазами, а также исключить разрушение ими NPL и целлобиозы в ходе определения.

Необходимо специально подчеркнуть, что пороговые концентрации целлобиозы, используемые для селективного ингибирования целлобиогидролазы I и, таким образом, разграничения вклада целлобиогидролазы I и эндоглюканазы в гидролиз NPL, могут вообще говоря, существенно отличаться для целлюлазных комплексов различного происхождения.

Как показывает рис. 6, степень ингибирования целлобиозой гидролиза NPL для различных препаратов по-разному зависит от концентрации ингибитора. Форма кривых 1, 2 на рис. 6 заставляет предположить наличие по меньшей мере двух компонентов, ингибирующихся целлобиозой: одного с $K_i \ll 0,1$ мМ и другого с $K_i \sim 1$ мМ, вероятно, ингибирующегося не до конца. Допуская, что наиболее сильно ингибирующийся компонент — это целлобиогидролаза I, а менее сильно ингибирующийся — эндоглюканаза, можно записать следующую систему уравнений для гидролиза NPL в условиях, когда K_m обоих ферментов больше концентрации субстрата, а K_i целлобиогидролазы (K_i^1) $\ll [I]$:

$$v = v^3 + v^1, \quad (1)$$

$$v_i = \frac{v^3(1 + \alpha [I]/K_i^3)}{1 + [I]/K_i^1}. \quad (2)$$

Здесь v — общая скорость гидролиза NPL (100%), а v^3 и v^1 (в %) — соответственно вклад эндоглюканазы и целлобиогидролазы I; v_i (%) — скорость гидролиза в присутствии ингибитора, K_i^3 — константа ингибирования эндоглюканазы целлобиозой, α — коэффициент, показывающий, какую остаточную активность по NPL имеет комплекс эндоглюканазы с целлобиозой.

Для расчета величины v^1 необходимо сначала найти величину α . Для этого можно продифференцировать уравнение (2) и получить

$$K_i^3 \frac{dv_i}{d[I]} + v_i + [I] \frac{dv_i}{d[I]} = \alpha v^3.$$

Численный расчет производной из зависимости v_i от $[I]_0$ не представляет труда.

Другой вариант определения α : совместное решение уравнений (2) для текущей ($[I]$) и максимальной ($[I]_{\max}$) из использованных концентраций ингибитора, которой соответствует значение $v_{i, \min}$:

$$v_i + v_i [I]/K_i^3 = v^3 + \alpha v^3 [I]/K_i^3, \quad (3)$$

$$v_{i, \min} + v_{i, \min} [I]_{\max}/K_i^3 = v^3 + \alpha v^3 [I]_{\max}/K_i^3. \quad (4)$$

Вычитая (4) из (3) и меняя знаки так, чтобы получить положительные разности, найдем

$$\frac{v_{i, \min} [I]_{\max} - v_i [I]}{[I]_{\max} - [I]} = K_i^3 \frac{v_i - v_{i, \min}}{[I]_{\max} - [I]} + \alpha v^3. \quad (5)$$

Линеаризация в соответствующих уравнению (5) координатах кривых 1—3 рис. 6 приведена на рис. 7. Из данных рис. 7 следует, что более сла-

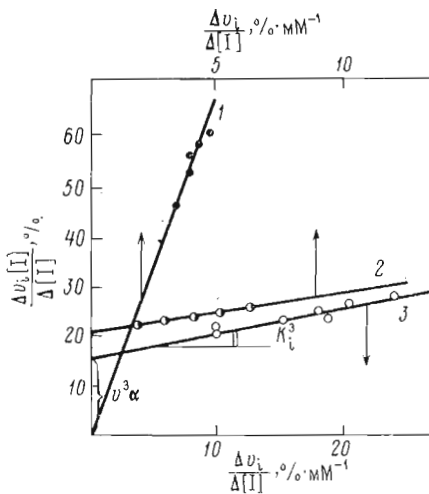


Рис. 7

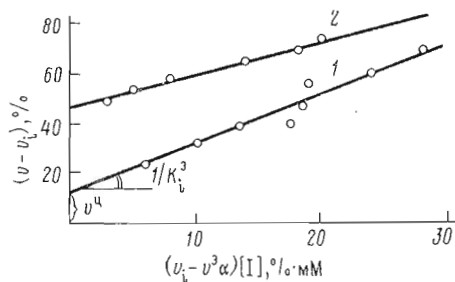


Рис. 8

Рис. 7. Определение константы ингибирования компонента с низким сродством к целлобиозе (K_i^3) и его предельной остаточной активности по NPL (αv^3) для препаратов *A. niger* (1), *T. reesei* (2) и *G. candidum* (3) в координатах уравнения (5).
Обработка данных рис. 6 (кривые 1–3)

Рис. 8. Определение относительного вклада в гидролиз NPL компонентов с высоким (v^4) и низким (v^3) сродством к целлобиозе для препаратов *G. candidum* (1) и *T. reesei* (2) в координатах уравнения (6). Обработка данных рис. 6 (кривые 1, 2)

бо ингибирующиеся компоненты препаратов *T. reesei* и *G. candidum* имеют K_i для целлобиозы соответственно 0,8 и 0,5 мМ, а значения αv^3 (остаточная активность по NPL при $[I] \gg K_i^3$) для них равны соответственно 21 и 16%. Препарат *A. niger* ингибируется целлобиозой с $K_i \approx 14$ мМ и компонентов с более высоким сродством к целлобиозе не содержит.

Используя полученные значения αv^3 , можно рассчитать вклад целлобигидролазы I (v^4), комбинируя уравнения (1) и (2) и представляя их в форме

$$\frac{(v_i - \alpha v^3) [I]}{K_i^3} + v^4 = v - v_i. \quad (6)$$

Линеаризация кривых 1, 2 рис. 6 в координатах уравнения (6) (рис. 8) позволяет определить значения K_i^3 , которые хорошо согласуются с вычисленными из рис. 7, а также v^4 и v^3 для *T. reesei* (47 и 53% соответственно) и *G. candidum* (13 и 87% соответственно), и, кроме того, рассчитать значения α , которые для эндоглюканазы этих препаратов составляют соответственно $\sim 0,4$ и $0,2$. Это означает, что в комплексе с целлобиозой эндоглюканаза *T. reesei* сохраняет 40% активности по NPL, а эндоглюканаза *G. candidum* – 20%. Такое положение не противоречит имеющимся сведениям о структуре активных центров эндоглюканаз, состоящих из ряда субсайтов и способных к образованию тройного комплекса: фермент – субстрат – ингибитор [15].

Сопоставление значений v^4 , найденных из рис. 8 (47 и 13% для *T. reesei* и *G. candidum* соответственно), и результатов определения целлобигидролазы I при подобранной для *T. reesei* концентрации целлобиозы 0,23 мМ (52 и 38% общей скорости гидролиза NPL данными препаратами соответственно; см. табл. 1) показывает, что если для *T. reesei* действительно получены близкие величины, то для *G. candidum* значения различаются почти в 3 раза. Это означает, что для каждого нового препарата требуется специальное исследование аналогично тому, как это показано на рис. 6–8.

Вклад целлобигидролазы I можно приближенно оценить и более простым путем, экстраполируя к нулю приближенно линейную зависимость степени ингибирования от концентрации целлобиозы в диапазоне

0,1—0,4 мМ (рис. 6, пунктир). Таким образом можно определить, что для *T. reesei* и *G. candidum* v^u приближенно составляет 47 и 17%, а для препаратов *A. niger* и *M. thermophila* $v^u=0$, т. е. в них нет фермента с высоким сродством к целлобиозе, аналогичного целлобиогидролазе I *T. reesei*.

Наконец, последнее, на чем следует остановить внимание,— это влияние на активность ингибирующих целлобиогидролазу I примесей, и прежде всего целлобиозы и фрагментов непрогидролизованной целлюлозы в исследуемых препаратах. Недавние данные [16] показывают, что целлобиогидролаза I очень прочно удерживает нековалентно связанные углеводы, присоединившиеся в процессе гидролиза целлюлозы, причем они не удаляются полностью при однократной гель-фильтрации на сефадексе G-25. Лишь после 2—3-кратной гель-фильтрации происходит их отделение с одновременным повышением активности целлобиогидролазы I по отношению к авицелу.

Наши данные [6, 7] также свидетельствуют об очень высоком сродстве целлобиогидролазы I к производным целлюлозы; так, для карбоксиметилцеллюлозы K_i гидролиза NPL составляла 0,1 мкМ. Поскольку в используемом нами методе применяются концентрации субстрата NPL, меньшие его K_m , метод особенно чувствителен к наличию в среде подобных ингибиторов, в частности целлобиозы в концентрациях менее 0,01 мг/мл (см. рис. 5). Между тем в процессе культивирования продуцентов целлюлаз целлюлоза или ее производные, выполняющие функцию индуктора и источника углерода (а следовательно, и целлобиоза), являются неприменимыми компонентами штатальной среды.

В этой связи нами изучалось влияние отделения низкомолекулярных примесей на активность целлобиогидролазы I в культуральной жидкости *T. reesei*. Как показывает рис. 6, если в исходной культуральной жидкости вклад целлобиогидролазы I в гидролиз NPL составляет только 25%, то после первой и второй гель-фильтрации (в присутствии 40% сахарозы, для более полного удаления связанных углеводов) он повышается до 45—47%, т. е. почти вдвое. Одновременно отношение активности по NPL к эндоглюканазной активности препарата повышается от $1,8 \cdot 10^{-3}$ (исходная) до $4 \cdot 10^{-3}$ и $4,9 \cdot 10^{-3}$ (первая и вторая гель-фильтрации соответственно), а содержание углеводов в препарате снижается от 0,74 до 0,28 мг на 1 ОЕ₂₈₀. Это говорит о том, что уже после однократной гель-фильтрации в присутствии сахарозы происходит почти полное демаскирование активности целлобиогидролазы I.

На основании проведенных исследований можно предложить следующую схему определения целлобиогидролазы I в целлюлазных комплексах:

1) препарат тщательно обессоливают для удаления целлобиозы и других возможных ингибиторов целлобиогидролазы;

2) спектрофотометрически при 340 нм непрерывно регистрируют активность обессоленного препарата по отношению к NPL (0,1—0,2 мМ). При необходимости также определяют оптимум рН активности препарата. Скорость гидролиза NPL в кювете при этом не должна превышать 15 мкМ/мин (эквивалентно $2 \cdot 10^{-3}$ М целлобиогидролазы I *T. reesei* [6, 7]), так как в противном случае может не выполняться условие $[E]_0 \ll [I]_0$ [6];

3) определяют таким же способом β -глюкозидазную и β -галактозидазную активности препарата в том же диапазоне чувствительности и временной развертки при концентрации соответствующих *p*-нитрофенил- β -D-гликозидов 0,1—0,2 мМ. При необходимости подбирают такие концентрации лактонов (0,1—0,2 г/л), чтобы остаточные активности гликозидаз по соответствующим гликозидам не превышали 10% активности препарата по NPL;

4) в присутствии выбранных концентраций лактонов определяют активность препарата по NPL при варьировании концентрации целлобиозы в диапазоне от 0,1 до 8 мМ. Регистрируют начальный участок (3—10 мин) кинетической кривой. Если наблюдается лаг-период, то это означает, что основной гидролиз происходит не под действием целлобиогидролазы I. В этом случае для расчетов используют начальную (а не ста-

ционарную!) скорость, так как именно она характеризует отщепление лактозного звена от NPL;

5) линейной экстраполяцией зависимости степени ингибирования или остаточной активности от концентрации ингибитора в соответствующих координатах (рис. 6—8) находят вклад целлюбиогидролазы I в гидролиз NPL.

Следует помнить, что, строго говоря, данный метод в применении к новым продуцентам позволяет судить только об активности фермента, имеющего наиболее высокое сродство к целлюбиозе ($K_1 \sim 10^{-5}$ M) среди ферментов, отщепляющих лактозу от NPL. В пользу того, что таким методом определяется именно целлюбиогидролаза I, т. е. фермент, играющий основную роль в деградации высокоупорядоченной целлюлозы, говорят следующие соображения: 1) наличие способности к гидролизу NPL и высокого сродства к целлюбиозе у всех множественных форм целлюбиогидролазы I *T. reesei*; 2) наличие такого компонента в препаратах *T. reesei* и *G. candidum*, эффективно разрушающих упорядоченную целлюлозу [14]; 3) отсутствие его в препаратах *M. thermophila*, *A. foetidus*, *A. niger*, относительно малоактивных к кристаллической целлюлозе [14].

Аддитивность действия эндогликаназы и целлюбиогидролазы I на NPL позволяет определять данным методом целлюбиогидролазу I в присутствии других компонентов целлюлазного комплекса и, в частности, корректно сводить баланс при очистке целлюбиогидролазы I. Можно полагать, что с учетом упомянутых ограничений данный метод с использованием доступного NPL будет полезен при выделении и характеристике целлюбиогидролазы I из различных, в том числе новых, продуцентов.

Экспериментальная часть

Синтез *n*-нитрофенил- β -D-лактозида (NPL) из отечественной D-лактозы (Союзреактив, ч.) выполнен по схеме, описанной в работе [17].

Гептаацетил- α -D-лактозилбромид (I) получен по методике [18], $[\alpha]_D^{+108,1^\circ}$ (с 1, хлороформ).

Гептаацетил- β -D-лактозилфторид (II). В перегонную колбу помещали 1,4 г (0,01 моль) фторгидрата 2,4,6-триметилпиридиния и 36 мг HgBr₂ в 3 мл абсолютного нитрометана. При нагревании и непрерывной отгонке нитрометана к смеси по каплям добавляли раствор 2,8 г (0,004 моль) бромида (I) в 5 мл абсолютного нитрометана. Через ~10 мин нагревание заканчивали, раствор охлаждали, разбавляли в ~5 раз эфиром, промывали 3 раза водой, сушили сульфатом натрия. Растворитель упаривали, остаток чистили на колонке с силикагелем в системе бензол — ацетон, 4,5 : 1, под давлением. Получили 1 г (40%) хроматографически чистого продукта (II); R_f 0,7 (силуфол; этилацетат — петролейный эфир, 7 : 3), R_f 0,4 (силуфол; бензол — ацетон, 5 : 1).

Гептаацетил-*n*-нитрофенил- β -D-лактозид (III). К раствору 0,55 г (0,86 ммоль) фторида (II), 0,131 г (0,95 ммоль) *n*-нитрофенола, 0,155 г (1 ммоль) 2,2,6,6-тетраметилпиперидона-4 в 3 мл абсолютного бензола при перемешивании добавляли по каплям раствор 0,28 мл эфира трехфтористого бора в 1 мл абсолютного бензола. Смесь перемешивали 1 ч при 20° C, разбавляли хлороформом, промывали водой, сушили сульфатом натрия, упаривали; остаток (0,55 г густого бесцветного масла) кристаллизовали из этанола. Получили 0,23 г (35%) хроматографически чистого (III), R_f 0,5 (силуфол; бензол — ацетон, 5 : 1), т. пл. 136—137° C.

n-Нитрофенил- β -D-лактозид (IV). В суспензии 0,23 г гептаацетата (III) в 5 мл абсолютного метанола добавляли каплю 1,39 н. раствора метилата натрия в абсолютном метаноле (осадок растворяется в течение ~2 мин, затем вновь выпадает); реакционную смесь оставляли на 1 ч при 5° C, осадок отфильтровывали и промывали 3 раза холодным метанолом, сушили в вакуум-экситаторе. Получили 0,12 г хроматографически чистого вещества, R_f 0,5 (силуфол; хлороформ — метанол — вода, 75 : 25 : 4), т. пл. 271—272° C.

В качестве субстратов и ингибиторов применялись также натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (средней вязкости, Serva, ФРГ), хроматографическая бумага № 1 (Whatman, Англия), целлюбиоза (Srofa, СССР), метил- β -D-целлюбиозид (Koch-Light, Англия), *n*-нитрофенил- β -D-глюко- и галактопиранозид (Lachema, СССР), δ -глюконо- и галактополактон (Serva, ФРГ).

В работе использованы индивидуальные целлюбиогидролазы I (pI 4,2) и целлюбиогидролазы II (pI 5,9), а также очищенный препарат эндогликаназа (pI 4,7—5,3), выделенные из культуральной жидкости мутантного штамма *Trichoderma reesei* с помощью аффинной хроматографии, ионообменной хроматографии на DEAE-сфереон-1000 и препаративного изо-

электрофокусирования в слое ультродекса [8]. Разделение множественных форм целлобиогидролазы I проводили путем изоэлектрофокусирования обессоленной фракции кислых белков с pI 3,8–4,2 после ионообменной хроматографии на DEAE-сфере в градиенте амфолинов 2,5–5 на приборе LKB 2117 Multifor при стартовом напряжении 200 В и токе 19,5 мА в течение 16 ч. Очищенная β -глюкозидаза *A. awamori*, выделенная путем ионообменной хроматографии на отечественном карбоксильном катионите, любезно предоставлена О. П. Белецкой (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР).

Использованы также следующие ферментные препараты: очищенные гель-фильтрацией на акрилексе П-6 целлоксандин Г10х (*G. candidum*) и пектофетидин ГЗх (*A. foetidus*; пектиназа-500), любезно предоставленные В. И. Максимовым (ВНИИбиотехнологии); SP 249 (Novo, Дания), представляющий собой сконцентрированный ультрафильтрат культуральной жидкости *A. niger* (108 МЕ/мл по эндоглюканазе); лиофилизированный препарат *Myceliophthora thermophila*, полученный из культуральной жидкости продуцента (любезно предоставлена Л. Г. Логиповой – Институт микробиологии АН СССР) осаждением сульфатом аммония при 100% насыщения, обессоливанием и депигментацией на DEAE-сфере (выход по эндоглюканазе – 60%, удельная активность эндоглюканазы 600 МЕ/г препарата, содержание углеводов 0,2 мг на 1 ОЕ₂₈₀), отношение активности по NPL к активности эндоглюканазы – $2,2 \cdot 10^{-4}$; неочищенная культуральная жидкость мутантного штамма *T. reesei* (3,1 МЕ/мл по эндоглюканазе) и она же, подвергнутая гель-фильтрации на акрилексе П-6 в присутствии 40% сахарозы.

Гель-фильтрацию культуральной жидкости *T. reesei*, а также концентрата *A. niger* (SP 249) осуществляли следующим образом. После 30 мин центрифугирования при 7000 г в супернатант добавляли сухую сахарозу из расчета 400 г/л и проводили гель-фильтрацию на акрилексе П-6, уравновешенном водой. Затем после концентрирования ультрафильтрацией на полых волокнах аналогичным образом гель-фильтрацию повторяли. Выход по активности эндоглюканазы для обоих препаратов после двукратной процедуры составлял соответственно 60 и 40%, удельная активность эндоглюканазы в растворе – 1,6 и 6,6 МЕ/мл, поглощение при 280 нм в 1-см кювете – 3,9 и 7,6, содержание углеводов – 0,28 и 1,59 мг на 1 ОЕ₂₈₀, отношение активности по NPL к активности эндоглюканазы – 4,9 и $0,68 \cdot 10^{-3}$.

Активность препаратов по фильтровальной бумаге определяли по методу Мандельс [19], эндоглюканазную активность – вискозиметрическим методом [20] в международных единицах (МЕ; мкмоль/мин). Белок определяли спектрофотометрическим методом [21], углеводы – по Дюбуа [22] с маннозой в качестве стандарта.

Спектральные и кинетические исследования гидролиза NPL проводили на регистрирующем спектрофотометре Бескман (США) в 1-см кварцевой кювете при 20° С. Стандартный кинетический эксперимент осуществляли следующим образом. В кювету вносили 0,1 мл δ -глюкополактона (2 г/л), 0,1–0,2 мл раствора NPL (1 мМ), 0,05–0,4 мл раствора целлобиозы (2 или 20 мМ; все – в 0,1 М ацетатном буфере, pH 4,5), буфер, pH 4,5, и ферментный раствор – до 1 мл. В контрольную кювету помещали 0,1–0,3 мМ раствор β -глюкозида в зависимости от поглощения раствора фермента и субстрата при 340 нм. Реакцию начинали добавлением раствора фермента, перемешивали и регистрировали кинетику возрастания поглощения при 340 нм при чувствительности 0,05–0,1 и скорости движения ленты самописца 0,1–1 дюйм/мин. Целлобиогидролазу I и ее изоферменты добавляли до концентрации 0,1–0,3 мг/мл, целлобиогидролазу II и β -глюкозидазу *A. awamori* – 0,5–1 мг/мл белка. Для препаратов *T. reesei* и *G. candidum* реакционная смесь содержала 0,3–0,4 МЕ/мл, *A. foetidus* 0,1 МЕ/мл, *M. thermophila* и *A. niger* – 0,5–1,5 МЕ/мл эндоглюканаз. Во всех случаях скорость гидролиза NPL не превышала 4 мкМ/мин (0,04 ОЕ₂₈₀/мин). Все кинетические эксперименты проводили как минимум в трех повторах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shoemaker S., Schweickart V., Ladner M., Gelfand D., Kwok S., Myamoto K., In-nis M. *Biotechnology*, 1983, v. 1, № 8, p. 691–696.
2. Seligy V. J., Barbier R., Dimock K. D., Dave M. J., Maranelli F., Morosoli R., Wil-lick G. E., Jaguchi M. *Biotechnol. Adv.*, 1984, v. 2, № 2, p. 201–216.
3. Van Tilbeurgh H., Claeysens M., de Bruyne C. K. *FEBS Lett.*, 1982, v. 149, № 1, p. 152–156.
4. Van Tilbeurgh H., Bhikhabhai R., Pettersson L. G., Claeysens M. *FEBS Lett.*, 1984, v. 169, № 2, p. 215–218.
5. Deshpande M. V., Eriksson K.-E., Pettersson L. G. *Anal. Biochem.*, 1984, v. 138, № 2, p. 481–487.
6. Мельник М. С. В кн.: Тезисы докл. VI республ. конф. молодых ученых-химиков. Таллин, 1985, с. 159.
7. Рабинович М. Л., Мельник М. С., Клесов А. А. *Биохимия*, 1985, т. 50, № 9, с. 1499–1503.
8. Рабинович М. Л., Савицкене Р. Ю., Герасимас В. Б., Мельник М. С., Новикова Т. В., Степонавичюс Ю. Ю., Денис Г. П., Клесов А. А. *Биоорганическая химия*, 1985, т. 10, № 10, с. 1330–1342.
9. Березин И. В., Клесов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: МГУ, 1976, с. 218–226.
10. Paice M. G., Destochers M., Rho D., Jurasek L., Roy C., Rollin C. F., De Miguel E., Jaguchi M. *Biotechnology*, 1984, v. 2, № 6, p. 535–539.
11. Maguire R. J. *Can. J. Biochem.*, 1977, v. 55, № 3, p. 644–650.
12. Shoemaker S., Watt K., Tsitovsky G., Cox R. *Biotechnology*, 1983, v. 1, № 8, p. 687–690.
13. Родионова Н. А., Туинова Н. А., Фениксова Р. В., Кудряшова Т. И., Мартинович Л. И. Докл. АН СССР, 1974, т. 214, № 5, с. 1206–1209.
14. Рабинович М. Л., Клесов А. А., Черноглазов В. М., Нгуен Ван Вьет, Березин И. В. Докл. АН СССР, 1981, т. 260, № 5, с. 1481–1486.
15. Клесов А. А. Ферментативный катализ. Ч. II. Ферментативная деструкция полимеров (Полимерные субстраты). М.: МГУ, 1984.
16. Allurralde J. L., Ellenrieder G. *Enzyme Microb. Technol.*, 1984, v. 6, № 10, p. 467–470.
17. Возный Я. В., Каличева Н. С., Галоян А. А. *Биоорганическая химия*, 1984, т. 10, № 9, с. 1256–1259.
18. Fischer E., Fischer H. *Ber.*, 1910, B. 43, S. 2521–2536.
19. Mandels M., Andreotti R., Roche C. *Biotechnol. and Bioeng. Symp.*, 1976, v. 6, p. 21–27.
20. Рабинович М. Л., Клесов А. А., Березин И. В. *Биоорганическая химия*, 1977, т. 3, № 3, с. 405–414.
21. Eisenkraft B., Veegar C. *Biochim. et biophys. acta*, 1968, v. 167, № 1, p. 227–238.
22. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. *Anal. Chem.*, 1956, v. 28, № 3, p. 350–356.

Поступила в редакцию
14.I.1986

p-NITROPHENYL- β -D-LACTOSIDE — SUBSTRATE FOR CONTINUOUS DETERMINATION OF CELLOBIOHYDROLASE I IN CELLULASE COMPLEXES

RABINOWITCH M. L., MELNICK M. S., NOVIKOVA T. V., TIKHOMIROV D. F.,
TALEBAROVSKAYA I. K.*, SICHGOLEV A. A.*, KLYOSOV A. A.

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

p-Nitrophenyl- β -D-lactoside (NPL) was synthesised for the selective determination of cellobiohydrolase (CBH) I in cellulase complexes. CBH I but not CBH II from *T. reesei* was found to hydrolyze NPL. Endoglucanase I from *T. reesei* can also split NPL. CBH I can be detected using its selective inhibition with low concentrations of cellobiose (0.1–0.2 mM), which do not affect the activity of endoglucanases. The presence of CBH I in crude cellulase preparation of *Geotrichum candidum* and the absence of this enzyme in *A. foetidus*, *A. niger* and *M. thermophila* cellulase preparations were demonstrated using this method.