



УДК 577.152.321'14

© 1990 г.

А. В. Гусаков, О. В. Протас, В. М. Черноглазов,
А. П. Синицын, Г. В. Ковальшева, О. В. Шпанченко,
О. В. Ермолова

РЕАКЦИИ ТРАНСГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЕ
ЦЕЛЛОБИОГИДРОЛАЗОЙ I ИЗ *TRICHODERMA*
LONGIBRACHIATUM ПРИ ДЕЙСТВИИ НА ПРИРОДНЫЕ
И СИНТЕТИЧЕСКИЕ СУБСТРАТЫ

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

При использовании 4-метилумбеллиферил- β -D-целлобиозида в качестве субстрата обнаружена способность целлобиогидролазы I из *Trichoderma longibrachiatum* катализировать реакции трансгликозилирования. При концентрациях субстрата более 2 мМ с помощью ВЭЖХ регистрировали образование Muf-гликозида тетрасахарида; на поздних стадиях реакции продукт трансгликозилирования подвергался последующему гидролизу. При концентрациях Muf- β -D-целлобиозида 2—10 мМ максимальное весовое содержание Muf-тетраозида достигало 1—4% от общего количества сахаров и их Muf-производных. В реакционной системе, содержащей 2,5 мМ Muf- β -D-целлобиозид и 10 мМ Muf- β -D-глюкозид, в качестве основного продукта трансгликозилирования образовывался Muf-триозид. Образование Muf-триозида в присутствии в качестве акцептора Muf- β -D-глюкозида наблюдали также при гидролизе природных субстратов целлобиогидролазы — нерастворимой целлюлозы и целлотриозы.

По современным представлениям, в состав целлюлазного комплекса входят три основных фермента, различающиеся по специфичности [1, 2]: эндо-1,4- β -глюканаза (КФ 3.2.1.4), экзо-целлобиогидролаза (КФ 3.2.1.91) и β -глюкозидаза (КФ 3.2.1.24). Для каждого компонента характерно образование множественных форм. Одним из интересных свойств, присущих некоторым целлюлолитическим ферментам, является способность катализировать реакции трансгликозилирования, т. е. реакции переноса углеводного остатка субстрата на акцептор, в роли которого может выступать другая молекула олигосахарида, в результате чего происходит удлинение углеводной цепи. Способность к трансгликозилированию наблюдали ранее у эндоглюканаз [3—6] и β -глюкозидаз [7—9]. Однако у целлобиогидролаз это свойство экспериментально не было обнаружено, хотя такая возможность в литературе обсуждалась [10].

В данной статье показана способность целлобиогидролазы I из *Trichoderma longibrachiatum* осуществлять реакцию трансгликозилирования. В качестве субстрата использовали Muf- β -D-целлобиозид, микрокристаллическую целлюлозу и целлотриозу, в качестве акцептора — Muf-производные глюкозы и целлобиозы. Благодаря высокому молярному коэффициенту поглощения метилумбеллиферилового остатка удалось детектировать различные продукты реакции с высокой чувствительностью.

Гидролиз Muf- β -D-целлобиозида под действием целлобиогидролазы I из *T. longibrachiatum* проводили при концентрациях субстрата 0,5—10 мМ. Основными продуктами реакции, по данным ВЭЖХ, являлись целлобиоза и метилумбеллиферон. Удельная активность целлобиогидролазы, определенная из значений максимальной скорости реакции и концентрации

Условные обозначения и сокращения: MUF — 4-метилумбеллиферон или Muf—4-метилумбеллиферил; G₁Muf, G₂Muf, G₃Muf, G₄Muf — 4-метилумбеллиферилгликозиды глюкозы, целлобиозы, триозы и тетраозы.

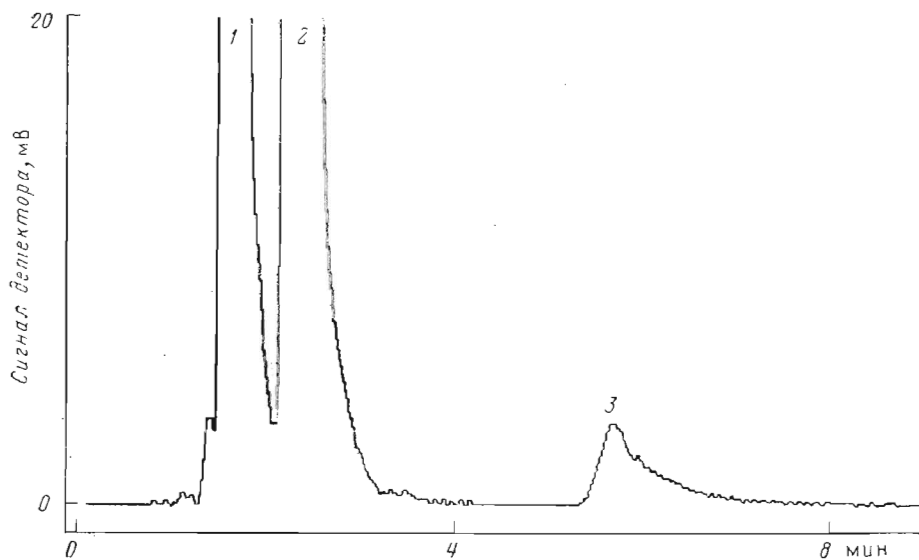


Рис. 1. Анализ методом ВЭЖХ MUF и MUF-производных, образующихся в реакционной системе, содержащей 10 мМ MUF-β-D-целлобиозид и 0,08 мг/мл целлюлозгидролазы. Время реакции 16 ч, pH 4,5, 30° С. При разделении использован градиент скорости потока 1,5–3 мл/мин. 1 — MUF и MUF-β-D-глюкозид. 2 — MUF-β-D-целлобиозид, 3 — MUF-тетраозид

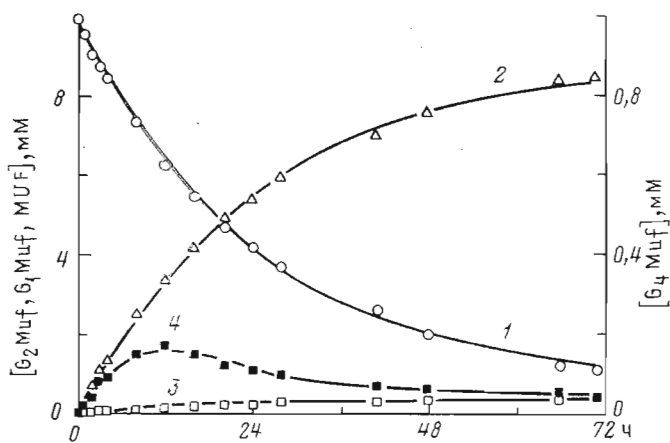


Рис. 2. Кинетика образования MUF и MUF-производных в реакционной системе, содержащей 10 мМ MUF-β-D-целлобиозид в качестве субстрата и 0,08 мг/мл целлюлозгидролазы, pH 4,5, 30° С: 1 — MUF-β-D-целлобиозид; 2 — MUF; 3 — MUF-β-D-глюкозид; 4 — MUF-тетраозид

белка, составила 80 нмоль субстрата/(мин·мг белка). Помимо указанных продуктов в ходе гидролиза в незначительном количестве (не более 3–4%) образовывался MUF-β-D-глюкозид. При концентрациях MUF-β-D-целлобиозид 0,5–2 мМ накопления других продуктов не наблюдали. Однако при более высоких концентрациях субстрата регистрировали образование неизвестного MUF-производного (рис. 1). Используя MUF-β-D-целлотриозид и MUF-β-D-целлотетраозид в качестве стандартов, это соединение идентифицировали как MUF-тетраозид. Содержание MUF-тетраозид возрастало с увеличением начальной концентрации MUF-β-D-целлобиозид. В ходе ферментативной реакции концентрация MUF-тетраозид достигала максимума и затем уменьшалась в результате последующего гидролиза (рис. 2). Максимальная концентрация этого продукта наблюдалась при степени конверсии субстрата 40–50%. При указанных условиях проведения экспериментов максимальное весовое содержание MUF-тетраозид составляло 1–4% от общего количества сахаров и их MUF-производных в системе.

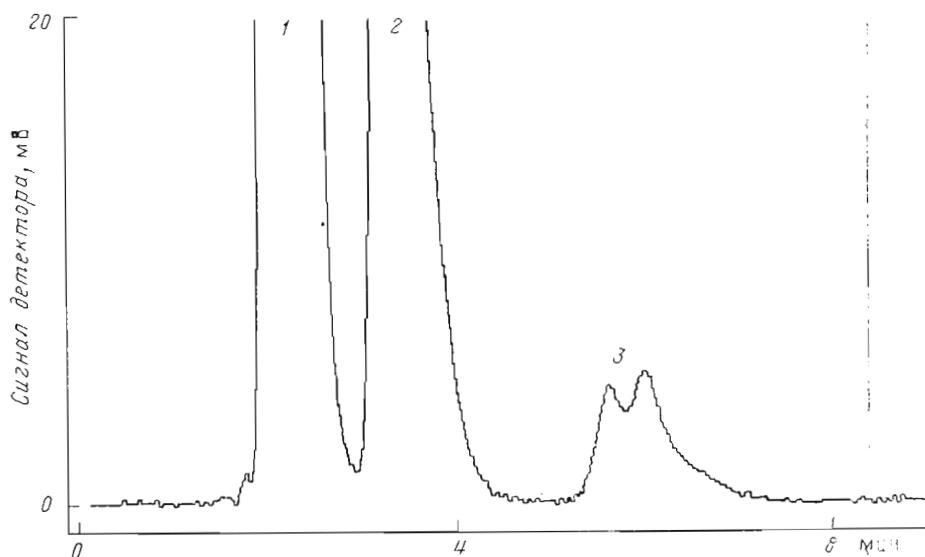
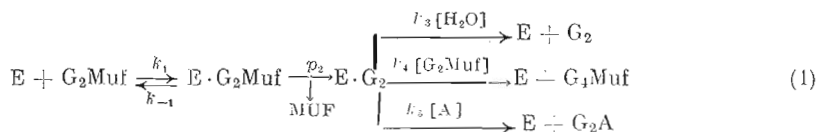


Рис. 3. Анализ методом ВЭЖХ MUF и Muf-производных, образующихся в реакционной системе, содержащей 2,5 мМ Muf- β -D-целлобиозид, 10 мМ Muf- β -D-глюкозид и 0,06 мг/мл целлобиогидролазы. Время реакции 8 ч, pH 4,5, 30° С. Скорость потока 1,5 мл/мин. 1 — MUF и Muf- β -D-глюкозид, 2 — Muf- β -D-целлобиозид, 3 — Muf-триозид

Простейшая кинетическая схема гидролиза, учитывающая протекание реакции трансгликозилирования, может быть представлена следующим образом:



На первой стадии ферментативного процесса происходит образование фермент-субстратного комплекса $E \cdot G_2Muf$, на второй стадии от молекулы субстрата отщепляется хромогенный остаток Muf и образуется комплекс целлобиозы с ферментом. На третьей стадии углеводный остаток комплекса $E \cdot G_2$ подвергается нуклеофильной атаке молекулой воды или Muf- β -D-целлобиозида с образованием соответственно целлобиозы или продукта трансгликозилирования — Muf-тетраозида. Акцептором углеводного остатка могут быть и другие сахара, присутствующие в системе (на схеме обобщенный акцептор обозначен как [A]). Так, например, если бы Muf- β -D-глюкозид находился в избытке в реакционной системе, можно было бы ожидать предпочтительное образование Muf-триозида как продукта трансгликозилирования.

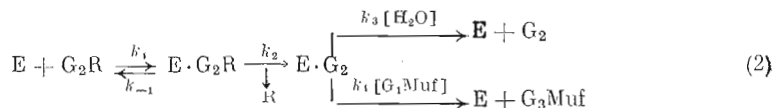
Для проверки этого предположения был проведен гидролиз Muf- β -D-целлобиозида (2,5 мМ) целлобиогидролазой в присутствии 4-кратного избытка Muf- β -D-глюкозида (10 мМ). Как и ожидалось, наблюдали образование Muf-триозида (рис. 3), максимальная концентрация которого достигала 0,15 мМ. Таким образом, этот эксперимент подтвердил способность целлобиогидролазы I катализировать реакции трансгликозилирования. Следует отметить, что пик образующегося Muf-триозида был двугорбым (рис. 3). Этот факт можно объяснить образованием Muf-триозидов с различными типами гликозидных связей. Известно, что в процессе трансгликозилирования возможно образование гликозидных связей, отличных от β -1,4. Например, показано, что в результате реакции трансгликозилирования, катализируемой β -глюкозидазой, предпочтительно образуются олигосахариды с β -1,6-глюкозидной связью [9].

Поскольку Muf- β -D-целлобиозид — синтетический субстрат и может изменять специфичность фермента, необходимо было выяснить, сохраняется ли трансферазная активность целлобиогидролазы при действии на

природные субстраты, в качестве которых были выбраны нерастворимая микрокристаллическая целлюлоза и целлотриоза. Таким образом, данные субстраты служили донором целлобиозного остатка. В качестве акцептора использовали Muf- β -D-глюкозид.

В реакционной смеси, содержащей 20 мМ целлотриозу и 10 мМ Muf- β -D-глюкозид, наблюдали интенсивное образование Muf-триозида. Максимальная концентрация продукта трансгликозилирования составила 0,3—0,4 мМ. В случае гидролиза микрокристаллической целлюлозы (20 г/л) в присутствии 10 мМ Muf- β -D-глюкозида образование растворимых продуктов реакции (главным образом целлобиозы) протекало довольно медленно и резко замедлялось через 1—2 ч. Тем не менее через 0,5—2 ч после начала реакции также наблюдали образование Muf-триозида в следовых количествах (примерно 0,01 мМ). Таким образом, продукт трансгликозилирования детектировался только в начальный период реакции, когда скорость гидролиза была более высокой.

Наблюдаемые закономерности образования Muf-триозида при гидролизе синтетического и природных субстратов хорошо объясняются в рамках кинетической теории, согласно которой максимальная концентрация промежуточного продукта зависит от соотношения скоростей образования и расходования данного продукта. В нашем случае гидролиз обобщенного донора целлобиозного остатка (G_2R), в качестве которого подразумеваются Muf- β -D-целлобиозид, целлюлоза или целлотриоза, в присутствии акцептора (Muf- β -D-глюкозида) может быть представлен в виде кинетической схемы



согласно которой при одинаковой концентрации акцептора (10 мМ) скорость образования Muf-триозида (и соответственно отношение скорости образования к скорости расходования) прямо зависит от скорости гидролиза донора целлобиозного остатка, которая увеличивается в ряду нерастворимая целлюлоза — Muf- β -D-целлобиозид—целлотриоза. Поэтому максимальная концентрация промежуточного продукта трансгликозилирования также должна увеличиваться в ряду целлюлоза — Muf- β -D-целлобиозид — целлотриоза, что и наблюдается в экспериментах (см. выше).

Таким образом, трансгликозилирующая активность целлобиогидролазы проявлялась при действии фермента как на синтетические, так и на природные субстраты, какими являются нерастворимая целлюлоза и целлотриоза.

В заключение необходимо отметить, что обнаруженная в настоящей работе способность целлобиогидролазы осуществлять трансгликозилирование позволяет по-новому взглянуть на механизм действия данного фермента и на классификацию целлюлаз в целом.[‡]

Экспериментальная часть

Целлобиогидролаза I была выделена из культуральной жидкости *Trichoderma longibrachiatum* путем фракционирования сульфатом аммония, гель-хроматографии на биогеле P-2 (Bio-Rad, США), ионообменной хроматографии на DEAE-сфереоне (Chemapol, Чехословакия) и ВЭЖХ на колонке Mono Q (Pharmacia, Швеция). Фермент был гомогенным по данным электрофореза в полиакриламидном геле и изоэлектрофокусирования. По результатам электрофореза и гель-хроматографии молекулярная масса целлобиогидролазы составила соответственно 65 000 и 54 000; изоэлектрическая точка 3,8. Подробно схема выделения и очистки фермента описана в работе [11]. При действии на карбоксиметилцеллюлозу фермент не снижал вязкости субстрата, т. е. эндоглюканазная активность в препарате очищенного фермента отсутствовала. При гидролизе целлоолигосахаридов фермент отщеплял целлобиозу с невозстанавливаю-

щего конца молекул субстрата. Удельная активность фермента по отношению к целлотриозе и целлотетраозе составила соответственно 0,31 и 1,04 мкмоль/(мин·мг белка).

В экспериментах использовали Muf- β -D-целлобиозид и Muf- β -D-глюкозид (Sigma, США), микрокристаллическую целлюлозу (Chemarol, СССР). Muf- β -D-целлотриозид и Muf- β -D-целлотетраозид, использованные в качестве стандартов в ВЭЖХ, синтезированы и любезно предоставлены Я. В. Возным (Институт биохимии АН АрмССР). Целлотриоза получена по методу [12].

Ферментативную реакцию проводили в термостатируемых при 30° С пробирках при pH 4,5 (0,1 М Na-ацетатный буфер). Общий объем реакционной смеси 1 мл, концентрация фермента при гидролизе Muf- β -D-целлобиозид и целлотриозы составляла 0,06—0,08 мг белка/мл, при гидролизе микрокристаллической целлюлозы — 0,2 мг/мл. В определенные моменты времени из реакционной смеси отбирали пробы объемом 100 мкл, разбавляли в 2,5 раза ацетонитрилом и центрифугировали.

Продукты ферментативной реакции анализировали методом ВЭЖХ на хроматографе фирмы Bio-Rad (США) серии 700. Хроматографическая система включала в себя насос высокого давления, термостатируемую при 25° С колонку Silasorb-NH₂ (4,6 × 250 мм), УФ-детектор (318 нм), дифференциальный рефрактометр, а также управляющую станцию Bio-Rad 700 на основе IBM/XT-совместимого компьютера. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил — вода. Для количественного определения MUF, Muf- β -D-глюкозида и Muf- β -D-целлобиозид использовали элюент с соотношением ацетонитрила и воды 90 : 10. Однако в этих условиях пики Muf-триозидов и Muf-тетраозидов размывались вследствие значительных времен удерживания данных компонентов. Поэтому для детекции Muf-триозидов и Muf-тетраозидов использовали элюент с содержанием ацетонитрила 80%. Следует отметить, что при соотношении ацетонитрил — вода 80 : 20 пики MUF и Muf- β -D-глюкозида не разделялись. В последнем случае, чтобы добиться элюирования всех компонентов реакционной смеси за относительно короткий промежуток времени и в виде узких пиков, использовали градиент скорости потока 1,5—3 мл/мин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ryu D. D. Y., Mandels M. // Enzyme Microb. Technol. 1980. V. 2. № 2. P. 91—102.
2. Ladisch M. R., Lin K. W., Voloch M., Tsao G. T. // Enzyme Microb. Technol. 1983. V. 5. № 2. P. 82—102.
3. Okada G., Nisizawa K. // J. Biochem. 1975. V. 78. № 2. P. 297—306.
4. Максимов В. И., Чурилова И. В. // Прикл. биохим. и микробиол. 1985. Т. 21. № 4. С. 456—460.
5. Fukumori F., Kudo T., Horikoshi K. // J. Gen. Microbiol. 1985. V. 131. № 12. P. 3339—3345.
6. Краева Н. Э., Рабинович М. Л., Клесов А. А., Березин И. В. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 290. № 2. С. 484—486.
7. Hash J. H., King K. W. // E. Biol. Chem. 1958. V. 232. № 1. P. 381—402.
8. Kanfer J. N., Raghaven S. S. // Biochim. et biophys. acta. 1975. V. 391. № 1. P. 129—140.
9. Гусаков А. В., Сидяцын А. П., Клесов А. А., Голдштейн Г. Х. // Биохимия. 1984. Т. 49. № 7. С. 1110—1120.
10. Рабинович М. Л., Черноглазов В. М., Клесов А. А. // Классификация целлюлаз. Распространение, множественные формы и механизм действия. «Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология». Т. 11. ВИНТИ, 1988.
11. Шпанченко О. В., Ермолова О. В., Черноглазов В. М. // Биохимия. 1990.
12. Jergensen M. A. // Aust. J. Chem. 1957. V. 10. № 1. P. 55—60.

Поступила в редакцию
10.VII.1989

После доработки
12.XII.1989

A. V. GUSAKOV, O. V. PROTAS, V. M. CHERNOGLAZOV, A. P. SINITSYN,
G. V. KOVALYSHEVA, O. V. SHPANCHENKO, O. V. ERMOLOVA

TRANSGLYCOSYLATION REACTIONS CATALYZED BY CELLOBIOHYDROLASE I
FROM *TRICHODERMA LONGIBRACHIATUM* IN THE HYDROLYSIS
OF SYNTHETIC AND NATURAL SUBSTRATES

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

Using 4-methylumbelliferyl β -D-cellobioside as a substrate, the ability of cellobiohydrolase I from *Trichoderma longibrachiatum* to catalyze transglycosylation has been demonstrated. At the substrate concentrations exceeding 2 mM, formation of a Muf-tetraoside was detected using HPLC. In the course of the enzymatic reaction, concentration of the transglycosylation product passed through a maximum, since at later stages the product was hydrolyzed. At Muf- β -D-cellobioside concentrations of 2–10 mM, the maximum weight content of Muf-tetraoside was 1–4% of the total content of saccharides. In the reaction system containing 2.5 mM Muf- β -D-cellobioside and 10 mM Muf- β -D-glucoside, Muf-trioside was formed as the main transglycosylation product. In hydrolysis of natural substrates (cellulose and cellotriose) in the presence of Muf- β -D-glucoside, formation of a Muf-trioside was also observed.