



УДК 577.154.33.08

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ.
VI. АДСОРБЦИЯ ЦЕЛЛОБИАЗЫ ЦЕЛЛЮЛАЗНОГО КОМПЛЕКСА
НА ЦЕЛЛЮЛОЗЕ

*Рабинович М. Л., Клесов А. А., Григораш С. Ю.,
Галкина И. А., Черноглазов В. М.*

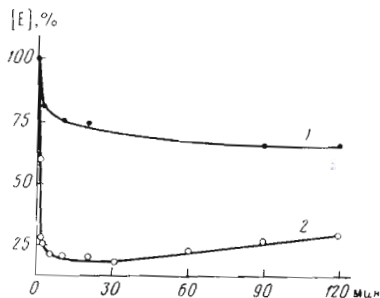
*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет, кафедра химической энзимологии*

Изучено влияние различных форм целлюлозы (микрорекристаллическая целлюлоза, измельченный хлопок) на активность и характер адсорбции целлобиазы из различных целлюлазных комплексов. Показано, что целлобиазы способны адсорбироваться на целлюлозе в pH-оптимуме действия фермента (pH 4.5). Адсорбция целлобиазы происходит менее эффективно, чем адсорбция эндоглюканазы из тех же источников, однако заметно лучше, чем адсорбция инертных белков, содержащихся в ферментном препарате. В адсорбированном состоянии целлобиазы прочно удерживаются на поверхности целлюлозы и не десорбируются растворимыми субстратами и ингибиторами, однако могут быть количественно десорбированы с сохранением активности при изменении pH раствора в нейтральную область. Целлобиазы из различных микробных источников заметно различаются по адсорбционной способности. Адсорбированные ферменты способны расщеплять свой естественный растворимый субстрат — целлобозу, однако их удельная активность снижается по сравнению с активностью фермента в растворе. При этом удельная активность адсорбированной целлобиазы из гриба *Trichoderma koningii* повышается с увеличением ее поверхностной концентрации. Обсуждаются роль адсорбированной целлобиазы в ферментативном гидролизе целлюлозы и регуляторное влияние поверхности целлюлозы на активность целлобиазы и других ферментов целлюлазного комплекса.

Первой стадией ферментативной дегградации целлюлозы, представляющей собой водонерастворимый биополимер, является адсорбция ферментов целлюлазного комплекса на поверхности субстрата. Есть основания полагать [1], что адсорбция целлюлаз не сводится только к концентрированию ферментов в зоне реакции, а играет определенную роль в повышении механической прочности целлюлозы и соответствующем ускорении дегградации субстрата за счет механохимических (точнее, механоэнзиматических) воздействий. На наш взгляд, именно в этих особенностях действия адсорбированных ферментов заключен ответ на вопрос, который остается открытым в течение последних 30 лет: почему одни целлюлазные препараты расщепляют принципиально только растворимые или аморфизованные полимерные производные целлюлозы, а другие эффективно деградируют и высокоупорядоченную, кристаллическую целлюлозу?

Существует еще один аспект данной проблемы, связанный с изменением активности целлюлазных ферментов при их адсорбции на поверхности нерастворимого субстрата. В особенности это относится к действию целлобиазы, одного из четырех ферментов целлюлазного комплекса [2], функция которой состоит в расщеплении целлобиозы, основного промежуточного растворимого продукта гидролиза целлюлозы, до глюкозы. Целлобиоза в свою очередь образуется в результате действия эндо- и экзоглюканазы целлюлазного комплекса непосредственно на нерастворимый субстрат. Распространено мнение, что целлобиаза не адсорбируется на поверхности целлюлозы, так как не действует на нее непосредственно [3, 4] и именно поэтому она может быть отделена при аффинной хроматографии на целлюлозе от прочно адсорбирующихся эндо- и экзофермен-

Рис. 1. Кинетика адсорбции целлюбиазы (1) и эндоглюканазы (2) целлюлозного препарата из *T. koningii* на 2% суспензии микрокристаллической целлюлозы с размером частиц 100–160 мкм. Исходная активность целлюбиазы 0,1 ед./мл, эндоглюканазы 1,5 ед./мл; 0,1 М натрий-ацетатный буфер; рН 4,5; 40° С



тов [4, 5]. В работах [6–8], посвященных изучению адсорбции целлюлолитических ферментов на целлюлозе, адсорбция целлюбиазы и ее возможное влияние на ферментативный гидролиз вообще не рассматриваются. Тем не менее в предыдущих работах [1, 9, 10] нами установлено, что целлюбиаза способна адсорбироваться на целлюлозе. В настоящем исследовании рассмотрены закономерности этого явления.

Адсорбция целлюбиазы на целлюлозе при перемешивании завершается в основном за 3–10 мин (см., например, рис. 1) при варьировании концентрации целлюлозной суспензии от 0,1 до 15% (вес.) и при проведении опытов в рН-оптимуме ферментативного гидролиза целлюлозы (рН 4,5). Дальнейшая инкубация в течение 2–3 ч не вызвала существенного изменения остаточной активности ферментов целлюлозного комплекса в растворе (рис. 1). Иногда наблюдается последующее медленное уменьшение количества фермента в растворе (кривая 1), а иногда незначительная десорбция фермента через продолжительный период времени (кривая 2). Целлюбиаза сорбируется менее полно, чем эндоглюканаза. Однако с ростом концентрации суспензии целлюлозы доля адсорбированного фермента закономерно возрастает. Например, при концентрации суспензии 15% (вес.) сорбируется свыше 85% целлюбиазы.

Мы показали, что промывание целлюлозы с адсорбированными ферментами через 2–3 ч после начала адсорбции чистым буфером (рН 4,5) при перемешивании в течение 1 ч не вызывает заметной десорбции, хотя при полной обратимости адсорбции в этих условиях должно было бы десорбироваться 30% адсорбированной эндоглюканазы и 70% адсорбированной целлюбиазы. Следует отметить, что в литературе имеются противоречивые данные о возможности десорбции целлюлозных ферментов с целлюлозы при рН 4,5. В работе [6] отмечается полная необратимость адсорбции в этих условиях, однако авторы [3, 11] считают, что адсорбция фактически является равновесной и обратимой, причем трехкратное промывание целлюлозы водой (рН 4,5) полностью удаляет адсорбированные на ней ферменты. Наши исследования кинетики действия целлюлолитических ферментов в колоночном реакторе с целлюлозой, а также обнаруженная нами двухфазная кинетика адсорбции эндоглюканазы на целлюлозе [1, 9, 10, 12] позволили сделать вывод о возможности двух типов адсорбции целлюлолитических ферментов: обратимого и необратимого, причем с течением времени быстрая равновесная обратимая адсорбция, очевидно, переходит в необратимую. К подобному выводу пришли недавно и авторы работы [13], изучавшие адсорбцию белков на полимерах. Переход во времени обратимой адсорбции в необратимую может, вероятно, объяснить разноречивые данные, имеющиеся в литературе. Причиной неполной обратимости адсорбции ферментов на целлюлозе может быть также наличие нескольких изоферментов целлюбиазы (эндоглюканазы), сильно различающихся по адсорбционной способности.

Представленные на рис. 2 зависимости величины адсорбции целлюбиазы и эндоглюканаза от концентрации ферментов в растворе построены на основе данных, полученных через 20 мин после начала адсорбции, и фактически характеризуют быструю стадию адсорбции, которая, по-видимому, является равновесной. Эти зависимости, по форме напоминающие изо-

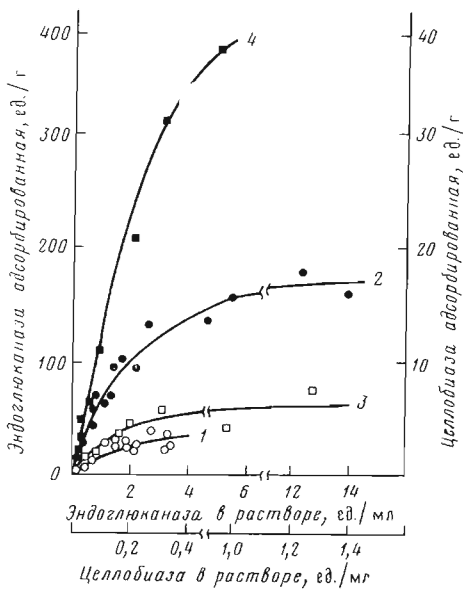


Рис. 2

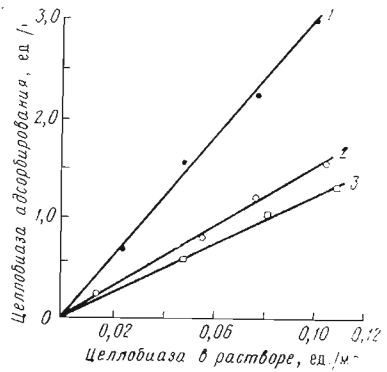


Рис. 3

Рис. 2. Зависимости величин адсорбции целлюбиаз (1, 3) и эндоглюканаз (2, 4) на микрокристаллической целлюлозе от концентрации ферментов в растворе: 1, 2 — адсорбция ферментов неочищенного препарата *T. koningii* на целлюлозе с размером частиц 100–160 мкм; 3, 4 — адсорбция ферментов очищенного препарата *T. lignorum* на целлюлозе с размером частиц 40–50 мкм

Рис. 3. Начальные участки зависимости величин адсорбции различных целлюбиаз на 2% суспензии микрокристаллической целлюлозы от концентрации ферментов в растворе; 20° С, рН 4,5; препарат *T. viride* (1), *Asp. foetidus* (2), *T. koningii*, очищенный гель-фильтрацией (3)

термы обратимой мономолекулярной адсорбции Лэнгмюра, на начальных участках достаточно хорошо описываются линейными изотермами Генри (рис. 2, 3). Лэнгмюровский характер изотерм адсорбции целлюлолитических ферментов отмечали также авторы работ [6, 7]. Если трактовать изотермы рис. 2 как истинные изотермы Лэнгмюра, то можно заключить, что величина предельной адсорбции целлюбиазы препарата из *Trichoderma koningii* (4,2 ед./г целлюлозы) значительно меньше, чем величина предельной адсорбции эндоглюканазы этого препарата (190 ед./г). Отсюда можно сделать вывод об очень плохой адсорбции целлюбиазы по сравнению с эндоглюканазой. Однако на форму изотермы и величину предельной адсорбции должно, очевидно, влиять присутствие других компонентов целлюлазного комплекса, а также инертных белков, способных адсорбироваться на поверхности целлюлозы. Как отмечается в работе [3], так называемые S_1 -фермент и S_x -ферменты целлюлазного комплекса, а также ксиланаза при совместном присутствии сорбируются на целлюлозосодержащем сырье хуже, чем каждый из ферментов в отдельности. То же, очевидно, должно относиться и к совместной адсорбции целлюбиазы и эндоглюканазы. Если исходить из предпосылок, используемых при выводе уравнения Лэнгмюра, то адсорбция фермента в присутствии других сорбирующихся белков может быть описана выражением

$$\frac{E_{o_i}}{a_i} = \frac{K_i [E_i]}{1 + \sum K_i [E_i]}, \quad (1)$$

где E_{a_i} — величина адсорбции данного (i -го) фермента (моль/м² поверхности или ед. акт./г сорбента, если используется сорбент с постоянной удельной поверхностью), a_i — величина предельной адсорбции данного фермента при отсутствии других белков (иначе — при образовании им

монослоя на поверхности), K_i — константа адсорбции фермента (M^{-1}), $[E_i]$ — равновесная концентрация фермента в растворе (M). Величина $\Sigma K_i [E_i]$ отражает влияние других ферментов и инертных белков на адсорбцию изучаемого фермента. Очевидно, что величины адсорбции различных компонентов оказываются связанными между собой:

$$\frac{E_{a_1}}{a_1} / \frac{E_{a_2}}{a_2} = \frac{K_1 [E_1]}{K_2 [E_2]} \quad (2)$$

Отсюда, в частности, следует, что для двух конкурирующих белков отношение величин адсорбции должно быть всегда пропорционально отношению равновесных концентраций в растворе.

При использовании препарата с постоянным соотношением компонентов выражение (2) позволяет найти соотношение значений предельной адсорбции разных ферментов при их совместном присутствии:

$$\frac{E_{a_1, \text{пред}}}{E_{a_2, \text{пред}}} = \frac{a_1 K_1 [E_1]_0}{a_2 K_2 [E_2]_0} = \frac{a_1 K_1 \alpha_1}{a_2 K_2 \alpha_2} \quad (3)$$

где α_1 и α_2 — мольные доли (или удельные активности) данных ферментов в исходном препарате.

С другой стороны, при малых концентрациях ферментного препарата, когда белки еще не конкурируют за поверхность, и в формуле (1) можно пренебречь величиной $\Sigma K_i [E_i]$ по сравнению с единицей, изотерма (1) приобретает линейный вид изотерм Генри:

$$\frac{E_{a_i}}{a_i} = K_i [E_i], \text{ или } E_{a_i} = a_i K_i [E_i] \quad (4)$$

Коэффициент пропорциональности между E_{a_i} и $[E_i]$, равный $a_i K_i$, как видно, не зависит от состава ферментного препарата (в отличие от величины предельной адсорбции $E_{a_i, \text{пред}}$) и является характеристикой взаимодействия данного фермента с данной поверхностью. Этот коэффициент может быть назван коэффициентом распределения фермента между раствором и поверхностью (K_p) и имеет размерность $л/м^2$ (или $л/г$, если используется сорбент с постоянной удельной поверхностью). Из выражений (3) и (4) окончательно следует, что

$$\frac{E_{a_1, \text{пред}}}{E_{a_2, \text{пред}}} = \frac{K_{p_1} \alpha_1}{K_{p_2} \alpha_2} \quad (5)$$

Таким образом, соотношение величин предельной адсорбции различных ферментов комплекса можно предсказать, зная лишь их коэффициенты распределения, определенные из линейной зависимости E_a и $[E]$, и соотношение активностей в исходном препарате.

Применение формулы (5) к адсорбции целлюлазы и эндоглюканазы препарата *T. koningii* показывает, что величины предельной адсорбции должны в этом случае различаться не менее чем в 40–60 раз (коэффициенты распределения соответственно равны $0,017 \pm 0,002$ и $0,066 \pm 0,004$ $л/г$, удельные активности 10 и 150 $ед./г$ препарата). Действительно, на опыте наблюдается близкое к предсказанному соотношение значений предельной адсорбции (45 раз). Это показывает, что целлюлаза и эндоглюканаза действительно конкурируют при адсорбции на поверхности целлюлозы, и малая величина предельной адсорбции целлюлазы из композиционного препарата обусловлена более низким содержанием ее по сравнению с эндоглюканазой. Поскольку большинство целлюлазных комплексов содержит значительно большее количество эндоглюканазы, чем целлюлазы [2], неудивительно, что адсорбцию целлюлазы заметить не удавалось. С другой стороны, сопоставление коэффициентов распределения эндоглюканазы и целлюлазы показывает, что они различаются всего в 3–4 раза. Далее, молекулы эндоглюканазы, как правило, имеют меньший молекулярный вес и меньшие размеры, чем молекулы целлю-

биазы [14, 15], и, следовательно, величина предельной адсорбции при полном заполнении поверхности должна быть для эндоглюканазы больше, чем для целлобиазы. Учитывая это, можно заключить, что истинные константы адсорбции эндоглюканазы и целлобиазы могут различаться весьма незначительно (в 1,5–2 раза или менее). Поэтому не исключено, что целлобиаза способна сорбироваться на целлюлозе не менее прочно, чем эндоглюканаза.

Помимо ферментов целлюлазного комплекса, конкурирующих с целлобиазой при адсорбции на целлюлозе, в ферментных препаратах, как правило, присутствуют и балластные белки, возможность конкурентной адсорбции которых также следует рассматривать. Из уравнения (1) следует, что при высоких концентрациях ферментного препарата в растворе доля поверхности, заполненной данным ферментом, выражается формулой

$$Q_{1, \text{ пред}} = \frac{E_{a_1, \text{ пред}}}{a_1} = \frac{K_1 \alpha_1}{\sum_i K_i \alpha_i},$$

которую можно заменить выражением

$$\frac{E_{a_1, \text{ пред}}}{a_1 K_1} = \frac{1}{\sum_i K_i \alpha_{ia} / \alpha_1 + \sum_j K_j \alpha_{jb} / \alpha_1}, \quad (6)$$

где величины α_{ia} отражают содержание различных целлюлолитических ферментов, а α_{jb} — содержание различных балластных белков в ферментном препарате. Величина $E_{a_1, \text{ пред}}/a_1 K_1$, которая может быть найдена экспериментально, пропорциональна предельной степени заполнения поверхности данным ферментом целлюлазного комплекса при адсорбции его из раствора композиционного препарата. Она зависит от относительного содержания изучаемого фермента по сравнению с другими ферментами целлюлазного комплекса и балластными белками в препарате. Согласно формуле (6), можно ожидать, что для очищенных препаратов, у которых соотношение активностей компонентов целлюлазного комплекса мало отличается от их соотношения в неочищенном препарате, степень заполнения целлюлозы адсорбированной целлобиазой будет превышать аналогичную величину для неочищенного препарата, причем тем значительнее, чем выше групповая очистка и прочнее связывание балластных белков.

Величина предельной адсорбции целлобиазы неочищенного препарата из *T. koningii* (соотношение целлобиазной и эндоглюканазной активностей 1:15) несколько меньше (в 1,5 раза), чем у высокоочищенного препарата *T. lignorum* (соотношение активностей 1:10), содержащего в 10 раз меньше балластных белков* (рис. 2). Однако это различие полностью объясняется большей удельной поверхностью адсорбента, использованного в последнем случае. В то же время величины $E_{a, \text{ пред}}/aK$, не зависящие от удельной поверхности адсорбента и характеризующие степень заполнения поверхности целлобиазой, для обоих препаратов одинаковы (~26 ед/л). Это показывает, что балластные белки, содержащиеся в неочищенном препарате из *T. koningii* в больших количествах, не влияют в сколько-нибудь заметной степени на адсорбцию целлобиазы на целлюлозе.

Из приведенных данных следует вывод, что по сорбционным свойствам многие целлобиазы ближе к эндоглюканазам, чем к балластным белкам. Ниже показано, что это подтверждается и при изучении сорбции целлобиаз на колонке с целлюлозой. Однако целлобиазы различного происхождения различаются по сорбционной способности по отношению к целлюлозе. В качестве характеристики сорбционной способности наиболее удобно использовать коэффициент распределения фермента между

* Целлобиазы этих препаратов имеют близкие адсорбционные свойства.

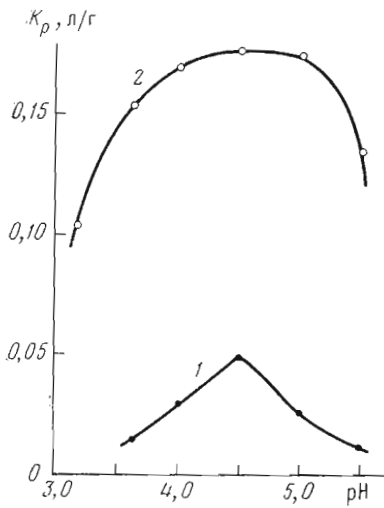


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость адсорбции целлюбиазы (1) и эндоглюканазы (2) *T. lignorum* измельченным хлопковым линтом (2% суспензия) от pH (20° С)

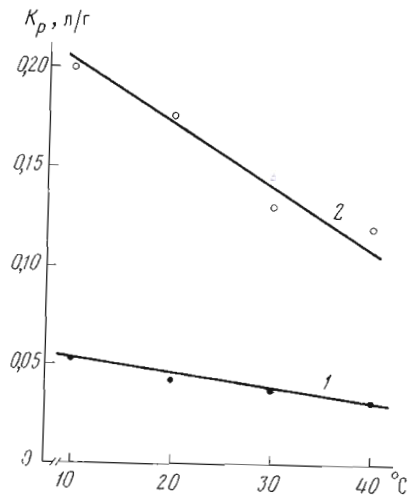


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость адсорбции целлюбиазы (1) и эндоглюканазы (2) *T. lignorum* измельченным хлопковым линтом (2% суспензия), pH 4,5, от температуры

раствором и адсорбентом (K_p), который на начальном линейном участке зависимости E_a от $[E]$ не зависит от полиферментного состава используемого препарата (см. выше). В условиях, когда истинная константа адсорбции фермента не может быть определена из-за конкуренции других ферментов целлюлазного комплекса, K_p — наиболее адекватная характеристика сорбции. Как видно из рис. 3, целлюбиаза препарата из *T. viride* сорбируется лучше (K_p 0,03 л/г), чем целлюбиазы препаратов из *Asp. foetidus* и *T. koningii* (0,013—0,015 л/г). Различия в сорбционной способности целлюлазных препаратов являются весьма важными в ферментативном превращении целлюлозы и, как будет показано в последующих статьях, определяют способность препарата к глубокому гидролизу природной (кристаллической) целлюлозы.

Адсорбция целлюбиазы имеет выраженный оптимум при pH 4,5, т. е. в условиях оптимума ферментативного гидролиза целлюлозы, в то время как для эндоглюканазы этот оптимум менее выражен (рис. 4). С понижением температуры адсорбция и целлюбиазы, и эндоглюканазы увеличивается (рис. 5), однако не очень значительно: в 1,5 раза при снижении температуры от 40 до 10° С.

Адсорбция целлюбиазы на колонке с целлюлозой при относительно небольших количествах пропускаемого через колонку фермента (0,4—1 ед./2,5 г целлюлозы) при pH 4,5 происходит почти полностью, на 85—90% (рис. 6). В то же время общая адсорбция белка в этих условиях, определенная по уменьшению поглощения при 280 нм на выходе колонки, составляет менее 20%. Следовательно, целлюбиаза сорбируется на целлюлозе избирательно по сравнению с балластными белками, хотя и не действует непосредственно на целлюлозу. Адсорбция целлюбиазы является весьма прочной, так как фермент не удаляется из колонки при пропускании до 100 свободных объемов буферного раствора ацетата натрия, pH 4,5. Глюкоза (0,1 М) и целлюбиоза (2 мМ) также не вызывают десорбции целлюбиазы, хотя при этих концентрациях их связывание с ферментом в растворе весьма значительно [9]. Вместе с тем при небольших скоростях элюирования пропускаемая целлюбиоза может полностью расщепляться адсорбированной целлюбиазой (рис. 6), которая, таким образом, сохраняет определенную каталитическую активность. По

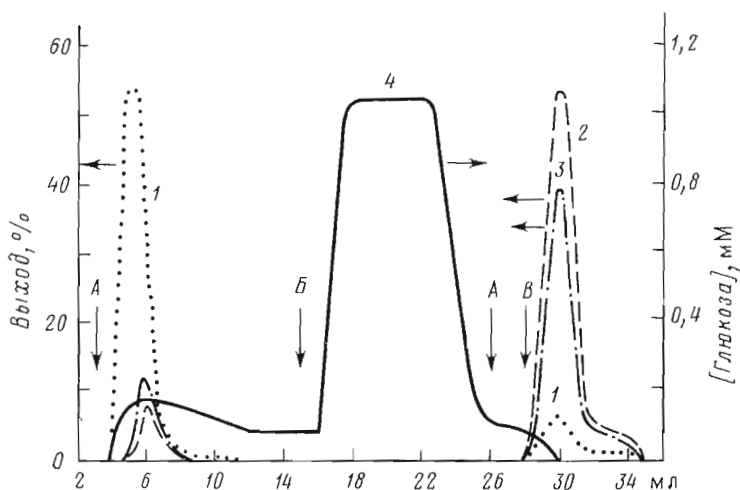


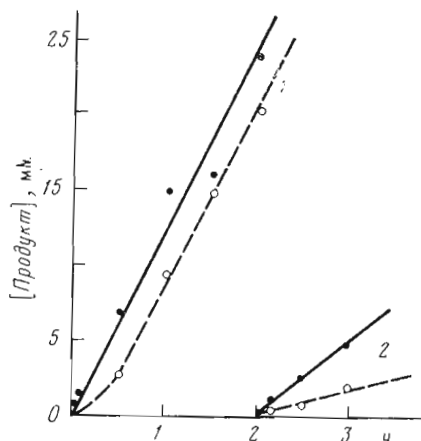
Рис. 6. Кривая элюции с колонки с микрокристаллической целлюлозой (2,5 г) после нанесения 0,1 мл раствора препарата *G. candidum*, содержащего 0,4 ед. целлюlobиазы и 0,5 ед. арил- β -глюкозидазы; 1 — белок, 2 — целлюlobиаза, 3 — арил- β -глюкозидаза, 4 — глюкоза. Смена элюентов на выходе: А — 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 4,5, В — раствор 2 мМ целлюlobиозы в этом же буфере, В — натрий-фосфатный буфер, рН 7

всей вероятности, значительная часть целлюlobиазы адсорбируется на целлюлозе без участия активного центра. Иначе говоря, при расщеплении нерастворимой целлюлозы может происходить естественная адсорбционная иммобилизация целлюlobиазы, сохраняющей активность. Адсорбированная целлюlobиаза, возможно, играет определенную роль, предотвращая локальное накопление целлюlobиозы вблизи поверхности и в порах нерастворимого субстрата, где действуют эндо- и экзоферменты, и снимая ингибирующее действие целлюlobиозы. Соиммобилизация нескольких последовательно действующих ферментов, как, например, эндоглюканаза, экзоцеллюlobиогидролаза и целлюlobиаза, на общей поверхности может приводить к заметному увеличению общей скорости реакции и уменьшению индукционного периода по конечному продукту, как это показано для других полиферментных систем [16].

В колонке также удалось наблюдать неодинаковую способность к адсорбции различных целлюlobиаз. Так, целлюlobиазы *Asp. niger* и *G. candidum* в одинаковых условиях сорбируются на целлюлозе соответственно на 35 и 85%. Форма нерастворимой целлюлозы также имеет существенное значение: адсорбция целлюlobиазы в колонке с измельченной хроматографической бумагой составляет 43%, а в колонке с микрокристаллической целлюлозой — вдвое больше (препарат *G. candidum*). Было обнаружено также, что при изменении рН элюента до 7 адсорбированные целлюlobиаза и арил- β -глюкозидаза количественно десорбируются с целлюлозы даже через длительный промежуток времени после адсорбции (рис. 6). Следовательно, в присутствии целлюлозы не происходит необратимой инактивации β -глюкозидаз, как это иногда наблюдается с ферментами на поверхности раздела фаз.

Активность адсорбированной целлюlobиазы. Как уже упоминалось, адсорбированная целлюlobиаза проявляет активность по отношению к целлюlobиозе. Однако ее удельная активность понижается по сравнению с растворенным ферментом. Это легко заметить, исследовав гидролиз целлюлозы целлюlobиазным комплексом в условиях, когда целлюlobиаза в основном находится в адсорбированном состоянии и лишь небольшая часть ее функционирует в растворе. Если раствор, содержащий неадсорбированные ферменты, заменить соответствующим буфером, скорость образования продуктов реакции заметно снизится, причем особенно сильно

Рис. 7. Образование глюкозы (пунктир) и восстанавливающих сахаров (сплошная линия) при ферментативном гидролизе 15% суспензии измельченного линта препаратом *G. candidum* (1 ед./мл эндоглюканазы, 0,2 ед./мл целлюlobлазы) в присутствии неадсорбированной части ферментов в растворе (20% общего количества) (1) и при замене раствора с неадсорбированными ферментами равным объемом буфера (2); рН 4,5 (40° С)



уменьшится образование глюкозы (рис. 7). При удалении неадсорбированных ферментов в реакционной смеси остаются ферменты, адсорбированные на целлюлозе, которые в условиях эксперимента составляют более 80% общего количества. Значительное уменьшение скорости реакции показывает, что небольшая часть ферментов, не адсорбировавшихся на целлюлозе, вносит существенный вклад в образование продуктов реакции, в особенности глюкозы. Одной из основных причин этого является, очевидно, более высокая активность целлюlobлазы в растворе, чем в адсорбированном состоянии.

Для индивидуальной целлюlobлазы из *T. koningii*, выделенной по методике [18], был более детально исследован эффект снижения активности в присутствии суспензий измельченного хлопкового линта различной концентрации. Оказалось, что общая активность целлюlobлазы уменьшается в 5–10 раз при увеличении концентрации суспензии линта от 0 до 5% (рис. 8). При определении активности целлюlobлазы в растворе выяснилось, что она уменьшается параллельно общей активности, оставаясь, однако, всегда меньше ее (рис. 8). Это подтверждает, что адсорбированная целлюlobлаза обладает некоторой собственной активностью. Однако, если количество адсорбированного фермента возрастает с увеличением концентрации суспензии, активность адсорбированного фермента снижается (рис. 8). При этом, чем меньше отношение исходной концентрации фермента к концентрации суспензии линта, тем ниже активность адсорбированной целлюlobлазы. Иначе говоря, удельная активность адсорбированной целлюlobлазы падает с уменьшением ее поверхностной концентрации (рис. 9). Этот эффект был подтвержден также при непосредственном измерении активности адсорбированной целлюlobлазы при различных соотношениях фермента и целлюлозы.

Наблюдаемые закономерности (рис. 9) являются не совсем обычными при адсорбции ферментов в условиях, далеких от насыщения поверхности адсорбента. Чаще наблюдаются обратные закономерности, когда удельная активность адсорбированного фермента уменьшается с увеличением его поверхностной концентрации. В рамках теории, развиваемой в работе [19], найденная нами закономерность может быть объяснена, например, диссоциацией адсорбированной молекулы целлюlobлазы, имеющей четвертичную структуру [15], на субъединицы с частичной потерей каталитической активности. Если же поверхностная концентрация целлюlobлазы возрастает, диссоциации не происходит. Альтернативное объяснение может заключаться в том, что на поверхности измельченного линта существуют центры адсорбции целлюlobлазы, в которых она ингибируется. Это могут быть, например, участки, содержащие окисленные глюкопиранозные остатки в конформации лактона, который является высокоэффективным ингибитором целлюlobлаз [20].

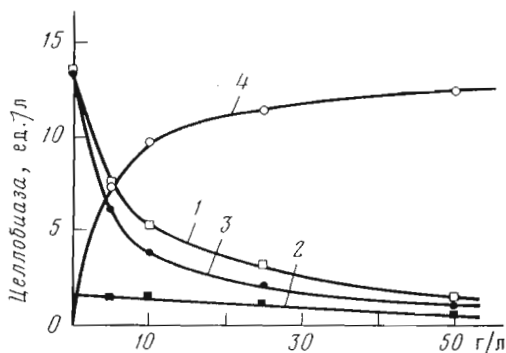


Рис. 8

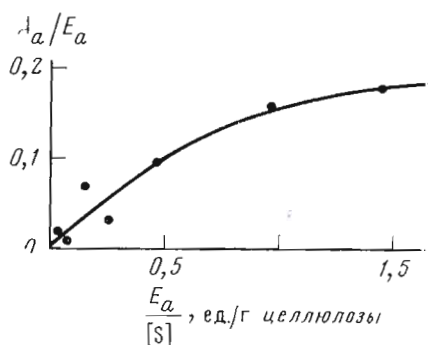


Рис. 9

Рис. 8. Зависимость адсорбции и активности очищенной целлобиазы *T. koningii* по отношению к целлобиозе (2 мМ) от концентрации суспензии измельченного линта: 1 — общая активность целлобиазы, 2 — активность адсорбированной целлобиазы, 3 — содержание целлобиазы в растворе, 4 — содержание адсорбированной целлобиазы. Исходная активность фермента 13,5 ед./л, pH 4,5 (40° С)

Рис. 9. Зависимость удельной активности адсорбированной целлобиазы *T. koningii* от величины, пропорциональной ее поверхностной концентрации (по данным рис. 8)

Согласно работам [14, 18], целлобиоза — промежуточный продукт ферментативного гидролиза целлюлозы — может регулировать активность эндо- и экзогликоканаз целлюлозного комплекса, в одних случаях ингибируя, а в других активируя эти ферменты. Целлобиоза, активность которой определяет уровень целлобиозы в реакционной смеси, также, очевидно, вовлекается в регуляцию активности ферментов целлюлозного комплекса, непосредственно действующих на нерастворимый субстрат. При ферментативном гидролизе целлюлозы целлобиоза действует в гетерогенной системе с развитой межфазной поверхностью. Как показано в настоящей статье, это может приводить к адсорбции целлобиазы на целлюлозе и к изменению ее каталитической активности. В свою очередь величина поверхности целлюлозы в ходе ее ферментативного гидролиза значительно изменяется. Сначала происходит диспергирование частиц целлюлозы и увеличение ее удельной поверхности, затем поверхность снова уменьшается вследствие растворения частиц в ходе гидролиза. В результате количество целлобиазы в растворе и общая целлобиазная активность, вероятно, могут зависеть от глубины реакции. Вначале целлобиоза сорбируется более полно, ее активность уменьшается, и целлобиоза накапливается, затем целлобиоза десорбируется благодаря гидролизу целлюлозы, и образовавшаяся целлобиоза расщепляется.

Таким образом, изменение поверхности целлюлозы в ходе реакции, активность целлобиазы и уровень целлобиозы в реакционной смеси оказываются взаимосвязанными и, вероятно, могут осуществлять тонкую регуляцию скорости образования глюкозы на разных стадиях ферментативного гидролиза целлюлозы. Этот случай, вероятно, можно отнести к особому типу так называемой адсорбционной регуляции ферментативной активности [21]. Результатом может быть, например, принципиальное изменение соотношения скоростей действия отдельных компонентов целлюлозного комплекса в ходе реакции. Приведенные соображения показывают, насколько сложной может оказаться реальная модель ферментативного гидролиза целлюлозы, учитывающая подобные регуляторные эффекты.

Экспериментальная часть

Для изучения адсорбции использованы препараты целлюлолитических ферментов и целлюлозы, охарактеризованные в табл. 1 и 2. Исследование адсорбции целлюлолитических ферментов на 0,1–15%-ных (вес.) суспензиях целлюлозы проводили в термостатируемых ячейках, снаб-

Характеристики использованных препаратов целлюлолитических ферментов

Источник	Способ получения (выпускающая фирма)	Активность, ед./г ^{1*}	
		целло- биазы	эндоллю- каназы
<i>Trichoderma koningii</i>	По методу [18]	10 000	80
То же	Гель-фильтрация на акрилексе II-6, ультрагеле АсА-34 ^{2*}	170	410
»	Осаждение 80% этанолом культураль- ной жидкости ^{3*}	10	150
<i>Geotrihum candidum</i> 3С	То же ^{4*}	40	250
<i>Aspergillus foetidus</i>	Гель-фильтрация на акрилексе II-6, ультрагеле АсА-34 ^{2*}	380	200
<i>Trichoderma lignorum</i> ОМ 534	НПО «Биохимреактив» (Олайпе, ЛатССР)	150	1500
<i>Trichoderma viride</i>	«Boehringer Mannheim» (ФРГ)	370	570
<i>Aspergillus niger</i>	«Sigma» (США)	35	330

* Активности в мкмоль субстрата/мин·г ферментного препарата определены по методам, описанным в работе [2].

^{2*} Для очистки использованы спиртоосажденные препараты, полученные во Всесоюзном научно-исследовательском биотехническом институте.

^{3*} Получен во Всесоюзном научно-исследовательском биотехническом институте.

^{4*} Получен в Институте биохимии им. А. Н. Баха АН СССР.

Таблица 2

Характеристика препаратов целлюлозы

Целлюлоза	Обработка	Размер частиц, мкм
Микрокристаллическая целлюлоза для колоночной хроматографии (Chemarol, ЧССР)	—	1—200
То же	Сухое рассеивание	100—160
»	»	40—50
Коротковолокнистый хлопок (линт, 4 сорт, 3 тип, ГОСТ 3318.0—72)	Обезвоживание эфиром, этанолом, измельчение на вибромельнице * 5 мин, промывание 10% NaHCO ₃ водой	20 (средний)
Хроматографическая бумага № 1 (Whatman, Англия)	Измельчение на кофейной мельнице 3 мин, промывание водой	Волокна

* Лабораторная вибромельница (шаровая, 1500 кол./мин).

женных магнитной мешалкой. В ячейку с соответствующим буфером вносили навеску целлюлозы и суспендировали перемешиванием. Через 5—10 мин вносили определенный объем ферментного раствора с известной активностью, затем отбирали из суспензии пробу, отделяли раствор от целлюлозы на стеклянном фильтре G3 и определяли в нем остаточную активность ферментов, а также концентрацию продуктов ферментативного гидролиза целлюлозы методами, описанными в работе [2].

При определении активности ферментов, адсорбированных на целлюлозе, по отношению к целлобиозе или к гидролизу адсорбента суспензию целлюлозы с адсорбированными ферментами фильтровали до отделения 95—97% раствора. Затем целлюлозу ресуспендировали в равном объеме буфера и регистрировали действие адсорбированных ферментов на целлюлозу-адсорбент либо на добавляемую целлобиозу (в условиях, когда действие ферментов на целлюлозу было незначительным). Отдельно определяли активность ферментов, оставшихся в растворе после фильтрования или десорбировавшихся с целлюлозы, и вводили поправку на их присутствие.

Количество адсорбированного фермента находили по разности между исходным количеством фермента и количеством фермента в растворе в

присутствии целлюлозы. Специальные исследования по изучению условий инактивации ферментов, а также по десорбции адсорбированных ферментов при рН 7 показали, что снижение активности ферментов в растворе в присутствии целлюлозы происходит исключительно благодаря их адсорбции, а не инактивации.

Построение зависимостей E_a от $[E]$ проводили на основании величин, измеренных через 20 мин после начала процесса адсорбции, когда быстрая стадия адсорбции практически закончилась. В последующие 50–60 мин изменение активности ферментов в растворе, как правило, не превышало 10% от изменения, наблюдаемого на быстрой стадии.

При изучении адсорбции целлюлолитических ферментов в колонке с целлюлозой использовали колонку с водяной рубашкой для термостатирования, имеющую высоту 10 см и внутренний диаметр 1,5 см. В колонку помещали 2,5 г целлюлозы в натрий-ацетатном буфере, рН 4,5, и уравновешивали этим буфером. Плотность заполнения составляла 0,35 г/см³. На колонку наносили небольшой объем концентрированного ферментного раствора в том же буфере (0,1–0,5 мл) и элюировали этим буфером с постоянной скоростью. На выходе колонки собирали фракции объемом 1 мл и анализировали на белок по поглощению на 280 нм, а также активность β -глюкозидаз и содержание продуктов реакции по методикам [2]. Свойства адсорбированных в колонке ферментов изучали путем пропускания через колонку растворов глюкозы (0,1 М), целлобиозы (2 мМ) в натрий-ацетатном буфере, рН 4,5, а также натрий-фосфатного буфера, рН 7, и анализа белка, ферментативной активности и продуктов реакции на выходе колонки.

Авторы благодарят канд. хим. наук И. В. Чурилову, любезно предоставившую очищенную целлобиазу культуры *T. koningii*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Klyosov A. A., Rabinowitch M. L. In: Enzyme Engineering: Future Directions / Eds Wingard L. B., Berezin I. V., Klyosov A. A. N. Y.: Plenum Press, 1980, p. 83–165.
2. Клесов А. А., Рабинович М. Л., Синицын А. П., Чурилова И. В., Григораш С. Ю. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1225–1242.
3. Ghose T. K., Bisaria V. S. Biotechnol. and Bioengng, 1979, v. 21, № 1, p. 131–146.
4. Haliwell G., Griffitt M. Biochem. J., 1978, v. 169, № 3, p. 713–815.
5. Weber M., Foglietti M. J., Percheron F. J. Chromatogr., 1980, v. 188, № 2, p. 377–382.
6. Mandels M., Kostick J., Parizek R. J. Polym. Sci., 1971, v. 36, № 2, p. 445–459.
7. Huang A. A. Biotechnol. and Bioengng, 1975, v. 17, № 8, p. 1421–1433.
8. Peitersen N., Medeiros J., Mandels M. Biotechnol. and Bioengng, 1977, v. 19, № 7, p. 1091–1094.
9. Рабинович М. Л. Кинетические аспекты действия карбогидраз (лизозим и целлюлолитические ферменты): Автореф. дис. на соискание уч. степ. канд. хим. наук. М.: МГУ, 1977. 16 с.
10. Рабинович М. Л., Клесов А. А. Сб. тез. II Всес. совещания по ферментам микроорганизмов. Минск. М.: 1978, т. I, с. 184.
11. Wilke C. R., Mitra G. In: Cellulose as a Chemical end Energy Resource / Ed. Wilke C. R. Biotechn. Bioeng. Symp. № 5, N. Y.: John Wiley and Sons, 1975, p. 253–274.
12. Rabinowitch M. L., Klyosov A. A. In: The Abstracts of II Int. Symp. on Bioconversion and Biochem. Eng. New Delhi: Scylark Printers, 1980, p. 53–56.
13. Soderquist M. E., Walton A. G. J. Colloid Interface Sci., 1980, v. 75, № 2, p. 386–397.
14. Wood T. M., McCrae S. Biochem. J., 1978, v. 171, № 1, p. 61–72.
15. Козловская Л. Н., Родионова Н. А., Акпаров В. Х., Пассишченко В. А., Безбородов А. М. Прикл. биохим. и микробиол., 1980, т. 16, вып. 1, с. 46–55.
16. Mattiasson B., Mosbach K. Biochim. et biophys. acta, 1971, v. 235, № 1, p. 253–257.
17. Клесов А. А., Рабинович М. Л., Чурилова И. В., Синицын А. П., Григораш С. Ю., Тихонова Т. В., Малиновская Л. М. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1337–1395.
18. Чурилова И. В., Максимов В. И., Клесов А. А. Биохимия, 1980, т. 45, вып. 4, с. 669–677.
19. Полторах О. М., Чухрай Е. С., Прякин А. И. В кн.: Успехи биоорганического катализа / Ред. Березин И. В., Мартинек К. М.: Изд-во МГУ, 1979, с. 57–104.
20. Bruchmann E.-E. Chem. Ztg., 1978, v. 102, № 11, S. 387–389.
21. Курганов В. И., Лобода Н. И. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 10, с. 1407–1419.

Поступила в редакцию
5.V.1981

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CELLULOSE. VI. ADSORPTION OF CELLOBIASE FROM CELLULASE COMPLEX ON CELLULOSE

RABINOVITCH M. L., KLYOSOV A. A., GRIGORASH S. Yu.,
KALNINA I. A., CHERNOGLAZOV V. M.

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

The effect of two different species of cellulose (Avicel and ball-milled cotton linters) on adsorption and behaviour of adsorbed cellobiases from various sources has been studied. It was shown that the pH-optimum for adsorption of cellobiases is equal to the pH-optimum of catalytic action of the enzymes (pH 4.5). Cellobiases from various sources differ from each other in their adsorptivity on cellulose. Adsorption of cellobiases was less efficient comparatively with endoglucanases from the same sources, but better than adsorption of non-cellulolytic proteins from cellulase preparations. Adsorbed cellobiases are firmly bound to the cellulose surface and cannot be desorbed by adding substrates or inhibitors. On the other hand, they can be desorbed quantitatively and with complete preservation of the activity by shifting pH to neutrality. Aryl- β -glucosidases from the cellulase preparations behave in this respect like cellobiases. The adsorbed cellobiases cleave their natural substrate, i. e. cellobiose, but with the diminished efficiency as compared to the soluble enzyme. The role of adsorbed cellobiases in enzymatic hydrolysis of cellulose and possible regulatory effects of the cellulose surface on the activity of cellobiase or other enzymes of the cellulase complex are discussed.