

# Изучение механизма термоинактивации целлюлазной ферментной системы *Trichoderma viride*

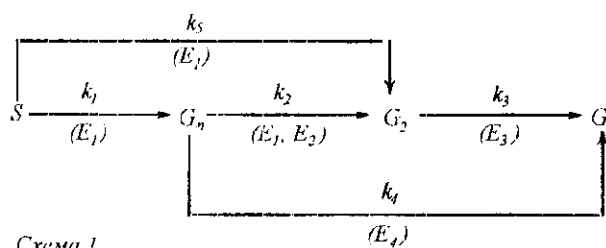
В. С. Цыганков, Л. К. Охотникова

Физический факультет Ростовского государственного университета  
344090, Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1

*Рассмотрен процесс термоинактивации целлюлазного комплекса *T. viride*. Сделано предположение о структурной организации целлюлазной системы ферментов в водном растворе.*

**Введение.** Кинетический механизм действия полиферментного комплекса целлюлазы, в частности *T. viride* [1], хорошо изучен. На нижеприведенной, достаточно упрощенной схеме 1 отражены основные пути гидролиза кристаллической целлюлазы [2—5].

Ферментный гидролиз целлюлазы происходит



в результате последовательно-параллельного действия нескольких ферментов, входящих в состав ферментно-целлюлазного комплекса. Эндоглюкогеназа ( $E_1$ ) атакует исходный нерастворимый субстрат  $S$ , приводя к образованию целлоолигосахаридов различной степени полимеризации  $G_n$ , а также целлобиозы  $G_2$ . Промежуточная целлобиоза образуется также под действием целлобиогидролазы

( $E_2$ ). Далее, по схеме, целлобиоза гидролизует до конечного продукта реакции, глюкозы  $G$ , под действием еще одного фермента, входящего в комплекс, целлобиозы ( $E_3$ ). Четвертый целлюлазный фермент эндоглюкозидаза ( $E_4$ ) шунтирует полиферментную систему, превращая промежуточные целлоолигосахариды непосредственно в глюкозу. На схеме не показаны процессы образования фермент-субстратных комплексов, ингибирование или активация ферментов промежуточными метаболитами и продуктами гидролиза. Говоря об образовании фермент-субстратных и фермент-ферментных комплексов, мы тем самым затрагиваем область регуляции ферментативной активности, где чаще всего упоминается четвертичная структура ферментов. Считается, что образование кластера биомолекул обязательно сопровождается значительными конформационными изменениями контактирующих белков. Однако аминокислотные остатки в активных центрах ферментов должны располагаться исключительно точно относительно друг друга и даже незначительные изменения структуры при взаимном приспособлении контактирующих поверхностей могут заметно отражаться на эффективности катализа. Поэтому ясно, что для ферментов с четвертичной структурой процессы ассоциации — диссоциации субъединиц обычно связаны с изменением биокаталитической активности [6, 7]. Эти процессы не относятся к процессам первого порядка и для них зависимость удельной каталитической активности от времени вообще не описывается одной экспонентой. В данной работе сделана попытка описать процесс термоинактивации целлю-

лазного комплекса *T. viride* (Tv) как распад уникальной четвертичной структуры. Рассматриваемый процесс сравнен с механизмом инактивации, предложенным в [8]. Авторы этой работы предположили, что термическая деградация ферментов с четвертичной структурой связана с реализацией по крайней мере двух типов процессов — диссоциацией ферментов на субъединицы и протеканием структурных изменений в отдельных субъединицах. Отсюда можно получить «каноническую» схему механизма термоинактивации ферментов с активной четвертичной структурой (схема 2).

Причем первая (I) стадия данного процесса — это так называемая «быстрая» стадия, вторая (II) — «медленная». Выяснение температурных границ термостабильности ферментных комплексов и механизма инактивации поможет расширить наши представления о природе действия и образования ферментных комплексов, имеющих четвертичную структуру.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали промышленный целлюлазный ферментный препарат *T. viride* производства Ладыжинского биохимического комбината без предварительного очищения. Для биохимического и диэлектрических измерений готовили 2 %-й водный раствор целлюлазы, рН 4,7. За единицу активности целлюлазы принимали такое количество фермента, которое, действуя на 50 мг хроматографической бумаги (производства «Whatman», Англия) при 50 °С в течение 1 ч образует 1 мг восстанавливающихся сахаров (пересчет вели по глюкозе). Активность рассчитывали по формуле [9]:

$$A = C/N \cdot t \cdot 1000, \quad (1)$$

где  $C$  — количество глюкозы, мкг;  $N$  — количество ферментного препарата в 1 см<sup>3</sup> реакционной смеси;  $t$  — время гидролиза, ч.

Диэлектрические измерения выполнены на автоматическом временном диэлектрическом спектрометре (ВДС), реализующем принцип метода «сосредоточенной емкости» в его последних модифика-

циях [10] с адаптацией применительно к объекту исследования данной работы [6, 7]. Установка представляет собой ВДС, перекрывающий диапазон частот от  $2 \cdot 10^5$  до  $3 \cdot 10^8$  Гц. Все процедуры измерения, регистрации, масштабной привязки, накопления и обработки данных осуществляются под управлением IBM компьютера. Процесс управления спектрометром производится в диалоговом режиме, причем результаты измерений могут быть представлены как в частотной, так и во временной областях. Данный автоматический спектрометр способен перекрывать широкий диапазон характеристических времен, который можно условно разделить на два поддиапазона: быстрых процессов ( $10^{-8}$ — $10^{-10}$  с) и медленных ( $10^{-6}$ — $10^{-3}$  с). Поскольку в данной работе основное внимание было уделено медленным процессам, то исследования проводили в интервале медленных времен. Для повышения разрешающей способности установки применяли дифференциальный метод измерений [11—13] с неэквидистантной выборкой по времени [10]. Интервалы между выборками составляли  $\omega_1 = 0,28$  нс,  $\omega_2 = 1,4$  нс и  $\omega_3 = 7,0$  нс при общем количестве выборок  $N = 1000$ . Число накоплений сигнала  $M = 100$ . Емкость измерительной ячейки  $C_0 = 0,99$  пФ, длина центрального проводника ячейки  $l = 10$  мм и диаметр  $d = 2$  мм. Так как растворы целлюлаз сильно электропроводны, то в качестве эталонного образца был выбран раствор NaCl с электропроводностью  $\sigma = 12 \cdot 10^{-3}$  См, такую электропроводность имеет раствор Tv после диализа по принципу «вода против воды» (четыре смены через 30 мин) при 25 °С.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены температурная зависимость биокаталитической активности (БА) целлюлазы *T. viride*. Представленные значения БА есть среднее из пяти независимых экспериментальных серий. Данную зависимость можно разделить на три температурные области I, II, III. В области II (с температурой от 30 до 50 °С) наблюдается непрерывное повышение значений БА Tv и, напротив, в области III (темпе-

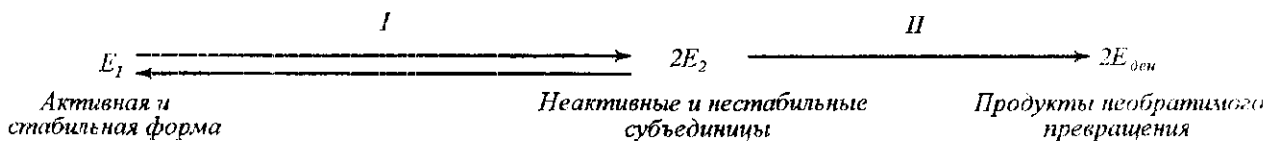


Схема 2

ратура от 50 до 70 °С) — ее спад. Область I будет рассмотрена ниже.

Интересные данные получены методом ВДС (рис. 2, 3). Столь сложный характер поведения зависимостей времен релаксации  $\tau$  (рис. 2) и эффективного объема  $V_{эфф}$  (рис. 3), который был рассчитан из хорошо известного соотношения:

$$\tau_0 = 3\eta V/kT, \quad (2)$$

где  $\eta$  — вязкость растворителя (температурная зависимость коэффициента вязкости воды представлена на рис. 2, кривая 2);  $\tau_0$  — времена диэлектрической релаксации;  $kT$  — энергия Больцмана, трудно объяснить какой-либо одной из известных моделей температурных зависимостей структурных параметров мономерных белков и ферментов [14—17]. По-видимому, ответ кроется в том, что считать в данном случае релаксирующим объектом. Если принять, что объект исследования — ферменты с четвертичной структурой, т. е. что целлюлолитические ферменты образуют мультиферментный целлюлазный комплекс (МФЦК), то полученные данные можно достаточно стройно интерпретировать. Действительно, из температурных зависимостей  $\tau$  и  $V_{эфф}$  видно, что процесс достижения максимальных значений БА сопровождается увеличением эффективного объема  $T_v$ . Причем при достижении максимума БА целлюлазы ( $T = 50—60$  °С)  $V_{эфф}$  увеличивается в 3—4 раза. Таким образом, можно предположить, что наблюдается ассоциат ферментов, характеризующийся общим эффективным объемом, т. е. в растворе присутствует МФЦК. Характер температурных зависимостей

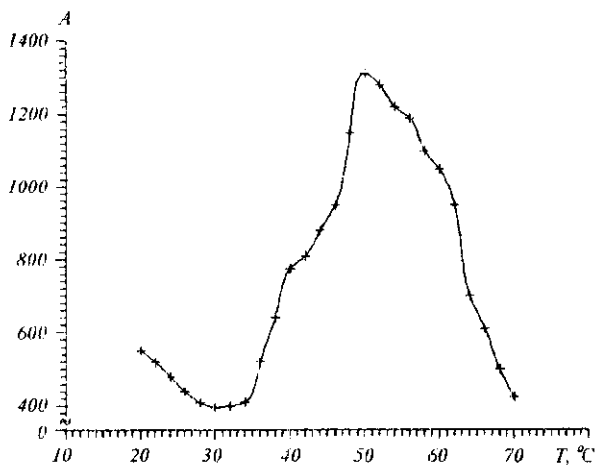


Рис. 1. Температурная зависимость биокаталитической активности (А, ед. БА) водного раствора полиферментной системы *T. viride*

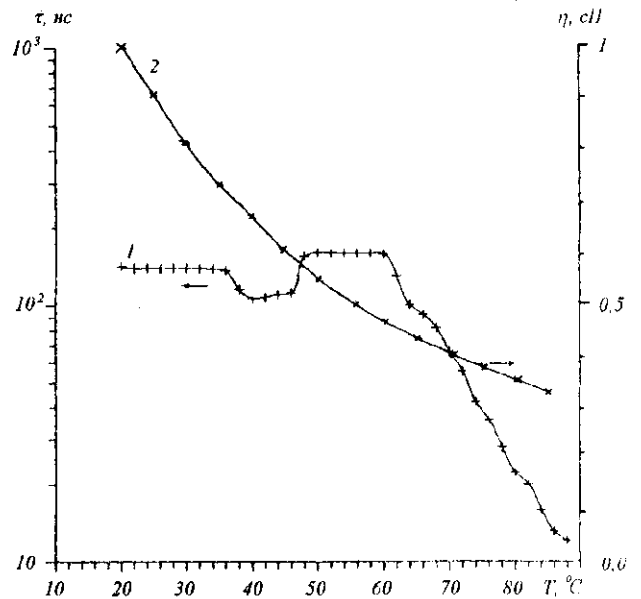


Рис. 2. Температурная зависимость времен диэлектрической релаксации водного раствора полиферментной системы *T. viride* (1) и вязкости растворителя (2)

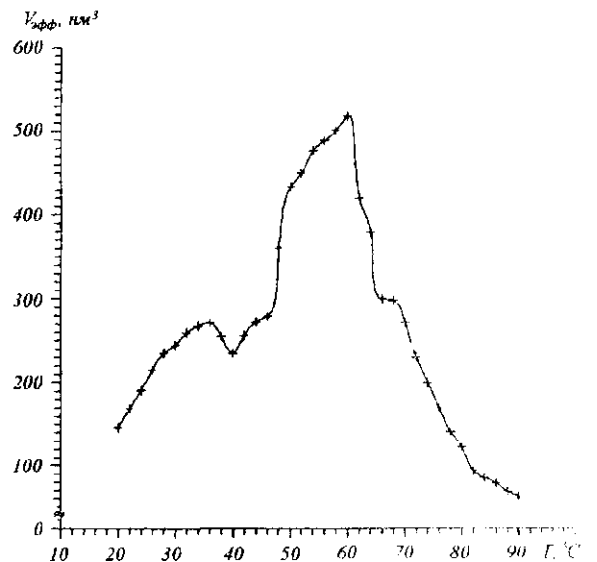


Рис. 3. Температурная зависимость эффективного объема полиферментной системы *T. viride*

$\tau$  и  $V_{эфф}$  в диапазоне температур 35—40 °С может описывать некие структурные перестройки МФЦК. по всей видимости, процесс обратной диссоциации комплекса без потери его биокаталитической активности (см. рис. 1—3).

Для более строгой интерпретации данных про-

ведено измерение коэффициента самодиффузии  $D_s$  методом ЯМР с импульсным градиентом поля [18, 19]. Данный метод позволяет исследовать самодиффузию молекул белка в водных растворах и, таким образом, наблюдать различные процессы, например, комплексообразование, фазовое расслоение, денатурацию и др., в которых происходит изменение трансляционной подвижности молекул. На рис. 4 представлены температурные зависимости  $D_s$  для воды (рис. 4, кривая 2) и ферментного комплекса (рис. 4, кривая 1). В температурном диапазоне

20—40 °С, по-видимому, имеет место процесс образования структуры МФЦК. В частности, в диапазоне температур 20—35 °С значения  $D_s$  медленно уменьшаются от  $6,5 \cdot 10^{-10}$  до  $6 \cdot 10^{-10}$  м<sup>2</sup>/с. Это объясняется увеличением эффективного объема диффундирующей единицы (см. рис. 3). Поскольку БА ферментного комплекса также испытывает некоторое понижение, то здесь можно говорить о частичной потере активности вследствие «подгонки» комплементарных поверхностей ферментов [20], входящих в состав данного комплекса, без резких структурных перестроек (см. рис. 2 и 4). Тогда как в диапазоне 35—40 °С наблюдается рост значений  $D_s$  (см. рис. 4, кривая 1) и уменьшение значений  $\tau$  (см. рис. 2), что может свидетельствовать в пользу предположения об обратимом распаде МФЦК в этом температурном диапазоне, когда отдельные ферменты дают положительный вклад в сигнал эхо и имеют более быстрые времена релаксации по сравнению с комплексом. Дальнейшее уменьшение коэффициента самодиффузии свидетельствует об увеличении общего эффективного объема МФЦК. При температурах выше 60 °С наблюдается второй резкий положительный скачок значений  $D_s$  и так как в этом температурном диапазоне БА резко падает, то можно предположить распад структуры МФЦК на отдельные неактивные компоненты с меньшими эффективными объемами (см. рис. 1 и 4).

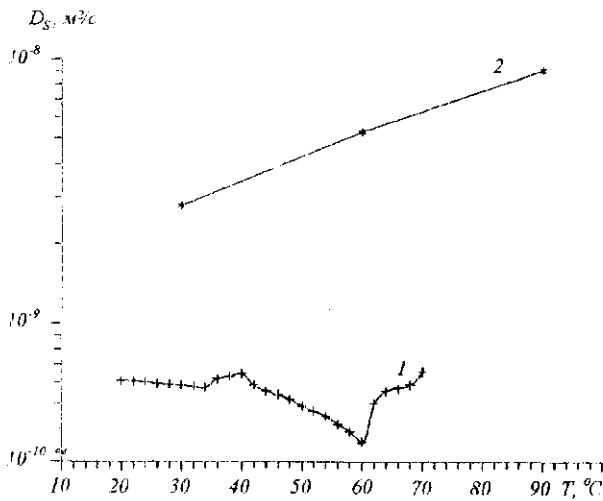


Рис. 4. Температурная зависимость коэффициента самодиффузии  $D_s$  полиферментной системы *T. viride* (1) и молекул воды (2)

Анализ полученных экспериментальных данных позволяет несколько дополнить схему 1. Диссоциация МФЦК ( $T = 35—40$  °С) на отдельные субъединицы не отражается на эффективности ферментативного катализа, что, по-видимому, можно объяснить самой природой целлюлолитических ферментов и температурным фактором, влияющим на эффективность катализа [21]. И поскольку

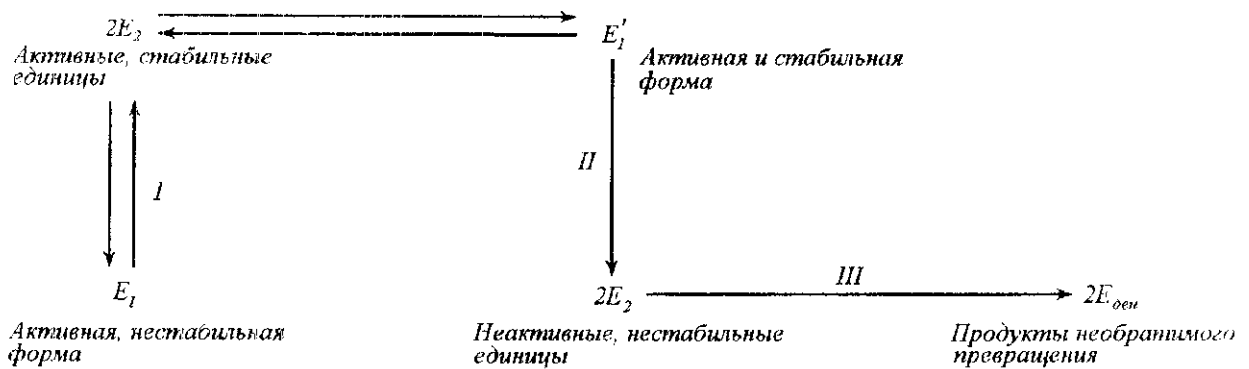


Схема 3

ку в дальнейшем (температуры 40—50 °С) мы наблюдаем рост БА (см. рис. 1) без каких-либо структурных перестроек (см. рис. 2 и 4, кривая 1), то, скорее всего, в температурном диапазоне 35—40 °С происходит окончательная сборка целлюлазного ферментного комплекса как функциональной единицы. Отсюда для класса мультиферментных комплексов, подобных *T. viride*, возможно получить следующую кинетическую схему термоинактивации (схема 3).

**Закключение.** Итак, основываясь на полученных данных, можно сделать вывод о том, что полиферментная целлюлазная система *T. viride* находится при определенных температурах в водном растворе в виде МФЦК. В ходе процесса термоинактивации образуемый мультиферментный целлюлазный комплекс *T. viride* проходит две стадии распада своей структуры. Первая — обратимая и не ведет к уменьшению его биокаталитической активности (стадия I (4)) вторая — необратимая и характеризуется процессом инактивации (стадия II (4)). На третьей стадии отмечается денатурация структур субъединиц, входящих в целлюлазный комплекс (стадия III (4)).

*В. С. Цыганков, Л. К. Охотникова*

Вивчення механізму термоінактивациі целюлазної ферментної системи *Trichoderma viride*

Резюме

Розглянуто процес термоінактивациі целюлазного комплексу ферментної системи *T. viride*. Зроблено припущення стосовно структурної організації целюлазної системи ферментів у водному розчині.

*V. S. Tsygankov, L. K. Ochootnikova*

The study of the mechanism inactivity of a system enzyme *Trichoderma viride*

Summary

The process of an inactivity of cellulalitic complex *T. viride* is considered. The model of a structure organization of a cellulalitic enzyme systems in water solution is suggested.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Родионова Н. А. Ферменты, катализирующие расщепление полисахаридов клеточных стенок высших растений // Итоги науки и техники.—М.: ВИНТИ, 1985.—(Биотехнология; Т. 19).
2. Klyosov A. A., Radinowitch M. L. Enzyme engineering. Future directions.—New York: Plenum press, 1980.—P. 83—165.
3. Клесов А. А., Григораш С. Ю. Новый подход к исследованию конформационных изменений (переходов) в активных центрах ферментов // Биохимия.—1980.—45.—С. 228—241.
4. Клесов А. А., Гурилова И. В. Новый ультразвуковой метод изучения состава и свойств полиферментных систем: ферменты целлюлазного комплекса // Там же.—С. 1685—1694.
5. Клесов А. А., Рабинович М. Л., Синицын А. П. Кинетика ферментативных реакций в гетерогенных системах // Биоорг. химия.—1980.—6, № 8.—С. 1225—1242.
6. Цыганков В. С., Зуев Ю. Ф., Курашов В. И. и др. Исследование температурных зависимостей диэлектрических характеристик целлюлолитических ферментов // Докл. АН СССР.—1992.—325, № 4.—С. 861—864.
7. Tsygankov V. S., Zuev Ju. F., Kurashov V. I. et al. Interconnection of the temperature dependences of the dielectric and biochemical characteristics cellulases enzymes // J. Chem. and Biochem. Kinetics.—1993.—1.—P. 31—35.
8. Полтарак О. М., Чухрай Е. С. Кинетика и механизм инактивации ферментов с четвертичной структурой // Вестн. МГУ.—1979.—20, № 3.—С. 195—211.
9. Рухлядева А. П., Польшалина Г. В. Методы определения активности гидролитических ферментов.—М.: Легкая промышленность, 1981.
10. Ermolina I. V., Polygalov E. A., Romanychev G. D. et al. Time-domain dielectric spectroscopy with nonuniform signal sampling // Rev. Sci. Instrum.—1991.—62, N 9.—P. 2262—2265.
11. Bone S. Time domain reflectometry: the difference method applied to conductive aqueous solutions // Biochim. et biophys. acta.—1988.—967.—P. 401—407.
12. Фельдман Ю. Д., Ермолина И. В. Химия и применение неводных растворов // Тез. докл. I Всесоюз. конф.—Иваново: Изд. ИХНР АН СССР, 1998.—Т. III.—С. 435.
13. Фельдман Ю. Д., Федотов В. Д. Изучение вращательной диффузии глобулярных белков методом временной диэлектрической спектроскопии // Журн. физ. химии.—1987.—61, № 8.—С. 2001—2012.
14. Брандтс Д. Ф. Структура и стабильность биологических макромолекул.—М.: Мир, 1973.—С. 174—254.
15. Веньяминов С. Ю., Долгих Д. А. Тез. докл. IV Всесоюз. конф. по спектроскопии белков.—Харьков, 1981.—С. 34.
16. Птицын О. Б., Гельманшин Р. И., Долгих Д. А. и др. Белковые глобулы без уникальной пространственной структуры: экспериментальные данные для  $\alpha$ -лактаальбуминов и общая модель // Биофизика.—1985.—10, № 3.
17. Лифшиц И. М., Гросберг А. Ю., Хохлов А. Р. Объемные взаимодействия в статистической физике полимерной макромолекулы // Успехи физ. наук.—1979.—127.—С. 553.
18. Maklakov A. I., Skirda V. D., Faktullin N. F. Self-diffusion in polymer systems. Encyclopedia of fluid mechanics / F. J. Cheremisinoff.—New York: Gulf Publ. Company, 1990.—Vol. 9.—P. 22.
19. Stejskal E. O., Tanner J. E. Self-diffusion measurements spin-echo in presence of time dependent field gradient // J. Chem. Phys.—1965.—42.—P. 228.
20. Фрелих Г. Ферменты: четвертичная структура и нуклеолярные комплексы.—М.: Мир, 1986.—С. 374.
21. Гусаков А. В., Синицын А. П., Клесов А. А. Влияние компонентов целлюлазного комплекса на кинетику гидролиза целлюлозы // Биохимия.—1982.—47, № 8.—С. 1322—1331.

Поступила в редакцию 05.10.97