

Д. А. Дубарь, лаборант ИГиЦ НАН Беларуси;  
 С. В. Кубрак, мл. науч. сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси;  
 А. Е. Дернович, студентка; Д. В. Галиновский, мл. науч. сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси;  
 В. В. Титок, зав. лабораторией ИГиЦ НАН Беларуси

### ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЭНДО- $\beta$ -1,4-ГЛЮКАНАЗЫ В РАСТЕНИЯХ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА

The main methods of measurement of endo- $\beta$ -1,4-glucanase is described, cup-plate test with plant extracts of fiber-flax cultivar K-65 is carried out. The necessity of previous purification of protein extract from minor stuff is approved. The main methods of protein purification are studied. Selected the most suit method of purification – gel-filtration with usage of Sephadex G100 gel.

**Введение.** Ферменты, относящиеся к классу эндо- $\beta$ -1,4-глюканаз (целлюлаз), встречаются во всех организмах, разрушающих целлюлозу или использующих ее в метаболизме. Целлюлаза гидролизует  $\beta$ -1,4-гликозидные связи в некристаллической целлюлозе, образуя олигосахариды и целлобиозу [1]. Целлюлоза является самым распространенным полимером растительного происхождения. Несмотря на то, что это регулярный полимер глюкозы, соединенной  $\beta$ -1,4-гликозидными связями, механизм его синтеза до конца не изучен. В растительной клетке макромолекулы целлюлозы объединены в микрофибриллы, входящие в состав клеточной стенки. В настоящее время процессы синтеза целлюлозы и сборки микрофибрилл активно изучаются во всем мире.

На данный момент известны только основные участники биосинтетического процесса, остаются невыясненными механизмы регуляции биохимических стадий синтеза целлюлозы, ее отложения и сборки, взаимодействия компонентов, обеспечивающих клетку функционально активной стенкой. В связи с важностью и многочисленностью выполняемых целлюлозой функций сборка клеточных стенок требует чувствительной, синхронизированной системы сигналов, ферментов и строительных блоков. Удобными объектами для изучения биосинтеза целлюлозы и образования клеточной стенки являются организмы, обладающие специфическими особенностями целлюлозного синтеза. Растения льна-долгунца характеризуются развитой флоэмной тканью, которая состоит из высокоспециализированных лубяных волокон, выполняющих механическую функцию. Клеточные стенки льняного волокна на 90% состоят из микрофибрилл целлюлозы, которые имеют кристаллические и аморфные области. В кристаллических областях молекулы целлюлозы четко ориентированы друг относительно друга, а в аморфных областях они не имеют строгой структуры.

В процессе биосинтеза целлюлозы участвуют крупные ферментные комплексы, компонентом которых может являться эндо- $\beta$ -1,4-глюканаз [2]. Основные закономерности действия этого фер-

мента являются общими для всех групп организмов, но в отличие от бактериальных и грибных  $\beta$ -глюканаз, растительные ферменты обладают более сложной регуляцией и механизмом действия [3–5]. Некоторые целлюлазы экспрессируются только в момент созревания плодов или опадания листьев [6]. Экспрессия других эндоглюканаз активируется при прорастании семян, росте гипокотилей и колеоптилей, что указывает на возможную роль данных ферментов в сборке и коррекции полисахаридов клеточной стенки [7, 8].

Изучение целлюлаз связано со специфическими проблемами – естественный субстрат нерастворим и состоит из структурно различных участков (аморфных и кристаллических областей), кроме того, множество экзо- и эндоглюканаз работают совместно в комплексе и имеют сложную систему регуляции. Изучение целлюлазного комплекса растений связано также с трудностями выделения, очистки и определения биохимических характеристик эндоглюканаз [9, 10].

Наиболее изученными являются целлюлазы грибного и бактериального происхождения, для исследования  $\beta$ -глюканаз грибов вида *Trichoderma* используются различные способы: определение редуцированных сахаров, вискозиметрический метод и чашечный метод.

Для определения редуцированных сахаров в качестве субстратов рекомендовано применять фильтровальную бумагу, карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ) или гидроксипропилцеллюлозу. Нерастворимый субстрат либо раствор субстрата известной концентрации обрабатывается определенное время при подходящей температуре раствором целлюлазы. После инкубации в раствор добавляется динитросалициловая кислота для определения концентрации глюкозы по оптической плотности при 540 нм [11].

Определение редуцированных сахаров можно также осуществлять с помощью метода Шомодьи – Нельсона, в котором используются те же принципы, но другие реагенты и спектрофотометрия проводится при 520 нм. Этот способ является более трудоемким из-за сложных реагентов, но и более точным – он позво-

ляет определить 5–100 мкг глюкозы в 4 мл раствора [12]. На основании полученных данных рассчитывали активность фермента по уравнениям, различным для каждого субстрата.

Количественное определение активности целлюлазы может быть проведено и с помощью вискозиметрического метода. Этот способ основан на изменении вязкости раствора КМЦ при ее расщеплении глюканазами. Сначала измеряют скорость истечения необработанного раствора КМЦ, вычисляют степень вязкости, затем в раствор добавляется целлюлаза и инкубируется определенное время. По разнице степени вязкости, через скорость истечения, контрольного и опытного образцов находится активность целлюлазы.

Качественное определение целлюлазы основано на связывании определенных красителей с субстратом, в частности с КМЦ. В качестве красителей могут быть использованы Конго красный, гексадецилтриметил аммоний бромид или йод Грама [13]. Наиболее доступным и простым является чашечный метод – на среду с КМЦ наносится раствор целлюлазы и через некоторое время обрабатывается красителем. Активность целлюлазы проявляется как зона просветления, так как краситель не связывается с продуктами распада целлюлозы. Для определения изоферментов целлюлаз проба может быть разделена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли [14] с SDS.

Цель данного исследования состояла в подборе наиболее удобного и доступного метода и адаптации его для определения активности именно растительных эндоглюканаз. Из вышеописанных способов нами был выбран чашечный метод определения активности целлюлазы.

**Основная часть.** В качестве объекта исследования применяли растения льна-долгунца сорта К-65. Для качественного определения активности целлюлазы использовали чашечный тест, разработанный для определения целлюлаз микроорганизмов [15].

Для стимуляции экспрессии эндо-β-1,4-глюканазы 5-суточные проростки льна обрабатывали 0,1%-ной 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (синтетический аналог ауксина). В опытах использовали обработанные и необработанные растения и 1%-ный раствор целлюлазы *Trichoderma viride* ( $U/mg = 1,8$ ) в качестве контроля. В чашку Петри заливали раствор 1,4%-ной агарозы и 0,6%-ный раствор КМЦ в соотношении 1 : 1. Для анализа применяли проростки на 3 сут после обработки. Навеску проростков (200 мг) фиксировали в жидком азоте и растирали в ступке. После отмерзания добавляли 400 мкл экстракционного буфера 1 (натрий-фосфатный буфер 20 мМ, рН = 6,2, содержащий 2,5% глицерина). Центрифугировали 15 мин при 13 000 об/мин. Супернатант использовали для определения буфером

растворимой целлюлазы (целлюлаза 1). Для получения буферо-нерастворимой целлюлазы (целлюлаза 2) осадок ресуспензировали с 200 мкл экстракционного буфера 2 (натрий-фосфатный буфер 20 мМ, рН = 6,2, содержащий 2,5% глицерина и 1 моль хлорида натрия). На гель наносили по 10 мкл экстрактов и контроля. Инкубировали 3 ч при 35°C. Наливали 0,1%-ный раствор красителя Конго красный на 30 мин. Добавляли 20–30 мл 1 М хлорида натрия на 10 мин для выявления зон энзиматической активности. В некоторых случаях приливали 1%-ную уксусную кислоту для изменения рН среды и более выраженной окраски.

Результаты чашечного теста с использованием растительных экстрактов представлены на рис. 1.

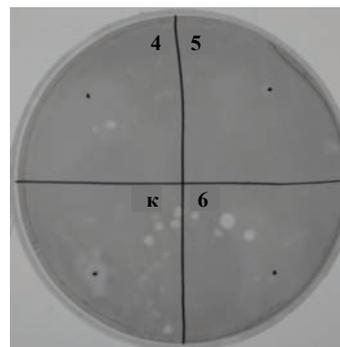


Рис. 1. Сектора 4, 5, 6 – растительные экстракты, сектор к – контроль

Пятна растительных экстрактов значительно отличались от контроля по форме, интенсивности и цвету. Контроль проявлялся как бледная зона просветления, а растительные экстракты как желтые пятна неправильной формы. Появление желтой окраски, вероятно, обусловлено не ферментативной активностью целлюлазы, а некоторым компонентом растительного экстракта. Для проверки этого предположения был проведен следующий опыт: из системы фермент – субстрат была исключена КМЦ (рис. 2).

В результате на чашке с КМЦ наблюдались ярко выраженные зоны во всех секторах, а на чашке без КМЦ, где отсутствовал субстрат для активности фермента, проявилась окраска только растительных экстрактов (рис. 2, сектора 1–4).

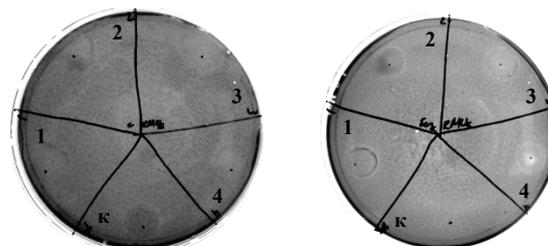


Рис. 2. Чашка слева содержит гель с КМЦ, справа – гель без КМЦ. Сектора 1, 2, 3, 4 – растительные экстракты, сектор к – контроль

Первым шагом в модификации методики было применение различных способов очистки экстрактов и определение их эффективности. На чашку без КМЦ наносили неочищенный экстракт, экстракты, очищенные различными методами, и контроль. Экстракты очищали хлороформом или поливинилпирролидоном. После инкубации экстрактов на агарозном геле без КМЦ неочищенный экстракт показал яркую окраску, а целлюлаза никак не выявлялась. В результате обработки поливинилпирролидоном появилось розовое окрашивание, а хлороформ лишь снизил яркость окраски. Ни один из вышеперечисленных методов не позволял очистить экстракт без дополнительных цветовых эффектов. Далее использовали метод гель-фильтрации для очистки фермента.

Растительный экстракт пропускали через колонку, заполненную гелем Sephadex G100, и наносили на среду без КМЦ, при этом окрашивания не наблюдалось. Поскольку гель Sephadex G100 пропускает молекулы массой до 100 кДа, а исследуемые целлюлазы имеют массу 50–70 кДа, следовательно, фермент должен проходить через гель.

**Заключение.** Таким образом, чашечный метод является простым и наглядным способом качественного определения активности целлюлазы, но для определения растительных β-глюкоаназ необходимо проводить очистку экстрактов методом гель-фильтрации.

### Литература

1. Рабинович, М. Л. Прогресс в изучении целлюлолитических ферментов и механизм биodeградации высокоупорядоченных форм целлюлозы / М. Л. Рабинович, М. С. Мельник // Успехи биологической химии. – 2000. – Т. 40. – С. 205–266.
2. Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana* / T. Desprez [et al.] // PNAS. – 2007. – Vol. 104, № 39. – P. 15572–15577.
3. Divne, C. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* / C. Divne, T. A. Jones // Science. – 1994. – Vol. 265. – P. 524–528.
4. Henrissat, B. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases / B. Henrissat, G. Davies // Curr. Opin. Struct. Biol. – 1997. – Vol. 7. – P. 637–644.
5. Reverbel-Leroy, C. The processive endocellulase CelF, a major component of the *Clostridium cellulolyticum* cellulosome: purification and characterization of the recombinant form / C. Reverbel-Leroy, S. Pages // J. Bacteriol. – 1997. – Vol. 179. – P. 46–52.
6. Varghese, J. N. Three-dimensional structures of two plant beta-glucan endohydrolases with distinct substrate specificities / J. N. Varghese // Proc. Natl. Acad. Science. – 1994. – Vol. 91, № 7. – P. 2785–2789.
7. Melhej, M. Towards Understanding the Role of Membrane-bound Endo-β-1,4-glucanases in Cellulose Biosynthesis / M. Melhej // Plant Cell Physiol. – 2002. – Vol. 43(12). – P. 1399–1406.
8. Campillo, E. Multiple endo-1,4-beta-D-glucanase (cellulase) genes in *Arabidopsis* / E. Campillo // Curr. Top. Dev. Biol. – 1999. – Vol. 46. – P. 39–61.
9. Hotchkiss, A. T. Evolution of the cellulosic cell wall in the *Charophyceae* / A. T. Hotchkiss, R. M. Brown // Cellulose and wood-chemistry and technology. – 1988. – Vol. 5. – P. 137–141.
10. Giddings, J. T. H. Visualization of particle complexes in the plasma membrane of *Micrasterias denticulata* associated with the formation of cellulose fibrils / J. T. H. Giddings, D. L. Brower, L. A. Staehelin // J. Cell Biol. – 1980. – Vol. 84. – P. 327–339.
11. Ghose, T. K. Measurement of cellulose activities / T. K. Ghose // Pure & Appl. Chem. – 1987. – Vol. 59, № 2. – P. 257–268.
12. Wood, T. M. Methods for Measuring Cellulase / T. M. Wood, K. M. Bhat // Methods in enzymology. – 1988. – Vol. 160. – P. 87–112.
13. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine / R. C. Kasana [et al.] // Curr. Microbiol. – 2008. – Vol. 57. – P. 503–507.
14. Coral, G. Some properties of carboxymethyl cellulose of *Aspergillus niger* Z10 wild-type strain / G. Coral, B. Arikani // Turk J. Biol. – 2002. – Vol. 26. – P. 209–213.
15. Mateos, P. F. Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum biovar. trifolii* / P. F. Mateos // Appl. Environ. Microbiol. – 1992. – Vol. 58. – P. 1816–1822.