

Н. А. РОДИОНОВА, Л. С. КАПИТОНОВА, Р. В. ФЕНИКОВА

МАЦЕРИРУЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ *CLOSTRIDIUM FELSINEUM*

(Представлено академиком А. И. Опариным 21 III 1972)

Состав и распределение в клеточной стенке и в срединной пластинке полисахаридов — пектиновых веществ, арабана, галактана, целлюлозы, ксилана — изучены недостаточно, так как способы их обнаружения (окрашивание неспецифическими реактивами, дифференциальное растворение и гидролиз) несовершенны.

С помощью реакций окрашивания кислых радикалов и эфиров установлено, что основу срединных пластинок составляет пектат кальция ⁽¹⁾, но в некоторых тканях содержатся высокоэтерифицированные пектины ⁽²⁾.

Большой вклад в изучение процесса мацерации должно внести применение высокоочищенных ферментов. Это позволит выяснить состав срединной пластинки и природу и свойства мацерирующих ферментов.

В последние годы были получены высокоочищенные препараты эндополигалактуроназы ⁽³⁾ и пектин-транс-элиминазы ⁽⁴⁾, обладающие сильным мацерирующим действием. Причем способность этих ферментов мацерировать разные ткани была различной. Это говорит о том, что, по-видимому, срединные пластинки так же, как и клеточные стенки, имеют неодинаковый состав и строение в различных тканях и органах одного и того же и разных растений.

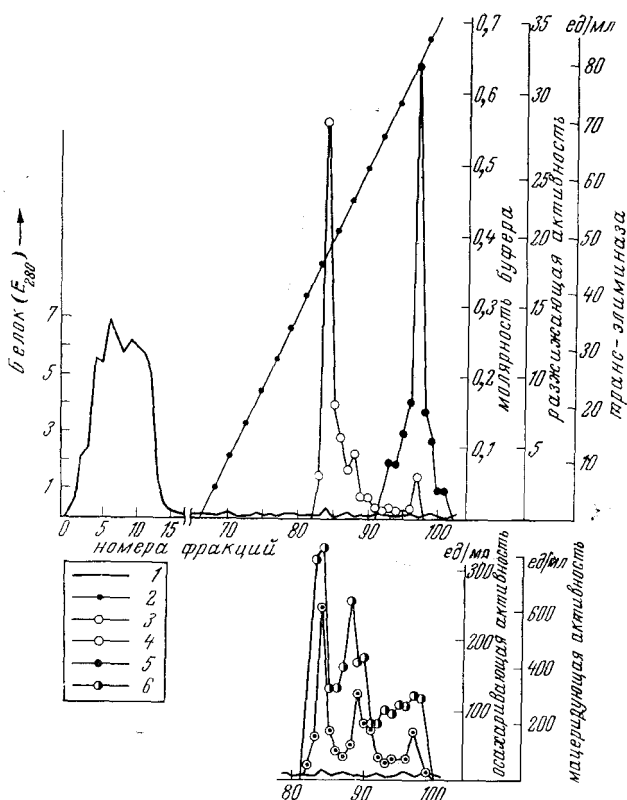
Возможно, по составу полисахаридов различаются и срединные пластинки коровой паренхимы и лубяных пучков льна. На этом, по-видимому, основано выделение лубяных пучков в процессе биологической мочки. Лубяные пучки, состоящие из 10—15 толстостенных клеток, расположены внутри коровой паренхимы. При мочке льна разрушаются срединные пластинки, соединяющие клетки паренхимы между собой и с лубяными пучками, а срединные пластинки между элементарными волокнами остаются. Имеются данные о том, что пектиновые вещества срединных пластинок лубяных пучков отличаются большей степенью этерификации и более устойчивы к биологическим и химическим воздействиям ^(5, 6).

Задачей нашего исследования было изучение, получение и очистка мацерирующих ферментов анаэробной бактерии *Clostridium felsineum* шт. № 5, выделенной со стеблей льна, подвергающихся тепловой мочке в производственных условиях в БССР.

Анаэробную бактерию *Clostridium felsineum* выращивали в течение 63 час. в десятилитровых бутылках на разработанной нами среде следующего состава: лактоза 20 г, пектин свекловичный 10 г, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 4 г, MgSO_4 250 мг, KH_2PO_4 3 г, K_2HPO_4 4 г, NaCl 1 г, FeSO_4 — следы, CaCO_3 5 г, дрожжевой экстракт 500 мг, аскорбиновая кислота 500 мг на 1 л среды. Культуральную жидкость отделяли от клеток центрифугированием при 6000 об/мин и определяли ее ферментативную активность (способность осахаривать пектовую кислоту — динитросалициловым методом Миллера ⁽⁷⁾; способность снижать вязкость растворов пектовой кислоты — методом Витакера ⁽⁸⁾); транс-элиминазную активность (по поглощению продуктами распада пектовой кислоты ультрафиолетового света при 235 мμ и хромогенов, образующихся с тиобарбитуровой кислотой при 510 и 550 мμ ^(9, 10)). Мацерирующую активность мы измеряли, определяя время разры-

ва тканей клубней картофеля (¹¹), пектинэстеразную активность — методом Кертца (¹²). Обладающая высокой мадерирующей способностью культуральная жидкость не содержала пектинэстеразу. В ней были обнаружены полигалактуроназа с рН оптимумом 5 в буфере трис-НСl и транс-элиминаза с оптимумом рН 8 в буфере трис-НСl. Транс-элиминаза активировалась 0,001—0,003 М СаСl₂ и угнеталась полностью 0,002 М ЭДТА. Оба фермента проявляли высокую активность на пектовой кислоте и зна-

Рис. 1. Хроматография на КМ-целлюлозе полигалактуроназы и пектат-транс-элиминазы из анаэробной культуры *Clostridium felsineum*, выращенной на среде с пектином. Размер колонки 75 × 3 см. объем каждой фракции 10 мл. 1 — белок, 2 — молярность буфера, 3 — разжижающая активность, 4 — осаживающая активность, 5 — транс-элиминаза, 6 — мадерирующая активность



чительно более пизкую на высокометоксилированном пектине и не проявляли никакой активности на полностью метилированной пектовой кислоте (дектине Линка), т. е. являлись полигалактуроназой и пектат-лиазой (транс-элиминаза пектовой кислоты). Оба фермента, по-видимому, действуют неупорядоченным «random» способом, так как и при рН 5 и при рН 8 снижение вязкости на 50% сопровождается расщеплением пектовой кислоты до редуцирующих веществ лишь на 5—7%. В пользу механизма неупорядоченного действия говорят также данные, полученные нами при изучении методом нисходящей хроматографии на бумаге продуктов расщепления пектовой кислоты в растворителе этилацетат — пиридин — вода — уксусная кислота в соотношениях 5 : 5 : 3 : 1 (¹³). Пятна олигогалактуронидов выявляли опрыскиванием хроматограмм анилинфталатом. После 5—10 мин. действия ферментов и при рН 5 и при рН 8 преобладали тетра-, три- и дигалактурониды. Через 24 часа инкубации в основном были найдены димеры и следы мономеров и тримеров. Максимальное расщепление пектовой кислоты происходило за 24 часа при рН 5 на 52% и при рН 8 на 40%. Кроме транс-элиминазы и полигалактуроназы пектовой кислоты культуральная жидкость *Clostridium felsineum* содержала арабаназу, галактаназу и не содержала С₁ и С_x ферментов целлюлазного комплекса и ферментов ксиланазного комплекса.

Из охлажденной культуральной жидкости осаждением четырьмя объемами охлажденного этилового спирта был получен ферментный препарат с выходом 10 г препарата (600 мг белка) из 1 л культуральной жидкости. Препарат был очень активен при мацерации тканей картофеля и стеблей льна. Вымачивание стеблей льна при применении этого ферментного препарата давало волокно высокого качества. Ферменты фракционировали методом ионообменной хроматографии на колонке с карбоксиметилцеллюлозой, уравновешенной 0,001 *M* ацетатным буфером pH 5 (рис. 1). Этим же буфером элюировалось более 95% от всего нанесенного белка; этот элюированный белок не обладал мацерирующей и пектолитической активностью (неактивный, балластный белок). Ферменты элюировали с колонки, применяя линейный градиент 0,001—0,7 *M* того же буфера с pH 5. При такой элюции происходило разделение полигалактуроназы и транс-элиминазы. Полигалактуроназа вымывалась двумя пиками при концентрациях 0,31—0,38 и 0,42 *M*, транс-элиминаза — при концентрациях 0,55—0,65 *M* буфера. Обе фракции полигалактуроназы и транс-элиминаза обладали высокой мацерирующей активностью. В процессе очистки удельная активность по сравнению с культуральной жидкостью I фракции полигалактуроназы возросла в 50 раз, II фракции — в 12 раз. Мацерирующая способность обеих фракций возросла в 70 раз. Степень очистки транс-элиминазы — в 24 раза. Ее мацерирующая способность возросла в 75 раз. Все изучаемые фракции были высоко активны при мацерации стеблей льна. Была проведена рехроматография ферментов. Рехроматография не дала увеличения удельной активности.

В опытах с очищенными ферментами были подтверждены их pH оптимумы (pH 5 — для обеих фракций полигалактуроназы, pH 8,5 — для транс-элиминазы), механизм неупорядоченного действия, субстратная специфичность; и полигалактуроназа и транс-элиминаза расщепляли пектовую кислоту, частично метилированный пектин и не расщепляли полностью этерифицированный пектин Линка. Фракция транс-элиминазы содержала следы арабаназной активности.

Таким образом, *Clostridium felsineum* шт. № 5 образует эндополигалактуроназу и эндо-транс-элиминазу пектовой кислоты. Поскольку бактерия не синтезирует пектинэстеразу, она может расщеплять только пектаты и неэтерифицированные участки пектина. Пектолитические ферменты *Clostridium felsineum* (эндополигалактуроназа и пектат-лиаза) обладают высокой способностью мацерировать ткани клубней картофеля и коровой паренхимы льна. Это говорит о том, что срединные пластинки этих тканей содержат значительное количество пектатов или низкометоксилированного пектина.

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

Поступило
14 III 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. H. McClendon, *Am. J. Bot.*, **51**, 628 (1964). ² P. Albersheim, U. Kilias, *Am. J. Bot.*, **50**, 732 (1963). ³ H. Suzuki, N. Henmi et al., *Technol.*, **45**, 1080 (1967). ⁴ S. Ishi, T. Youkoutsuka, *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1157 (1971).
- ⁵ А. А. Красивская, *Изв. высш. учебн. завед., Технология текстильной промышленности*, № 5 (1959). ⁶ И. А. Макринов, *Биологическая мацерация растительных тканей*, М., 1941. ⁷ J. Miller, *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959). ⁸ D. R. Whitaker, K. R. Hanson, P. K. Datta, *Canad. J. Biochem. and Physiol.*, **41**, 671 (1963).
- ⁹ P. Albersheim, H. Neukom, H. Deuel, *Helv. chim. acta*, **43**, 1422 (1960). ¹⁰ H. Neukom, *Chimia*, **14**, 165 (1960). ¹¹ Т. В. Аристовская и др., *Большой практикум по микробиологии*, М., 1962. ¹² L. J. Kertesz, *The Pectic Substances*, N. Y., 1951.