

# Viskosimetrische Bestimmung der Cellulaseaktivität unter Verwendung eines Natriumcarboxymethylcellulose-Substrates

Von

M. Tschetkarov, D. Koleff\* und Stefanka Banikova

Fakultät für Physik der Universität, Sofia, und Chemisch-Pharmazeutisches  
Forschungsinstitut, Sofia, Bulgarien

Mit 8 Abbildungen

(Eingegangen am 23. Juni 1966)

Die Kinetik der Hydrolyse von Natriumcarboxymethylcellulose (Na—CMC) unter der katalytischen Wirkung eines Cellulase-Enzyms wurde mit Hilfe einer viskosimetrischen Methode, welche die aus einer früher aufgestellten Theorie<sup>20</sup> resultierenden Schlußfolgerungen anwendet, bestimmt. Die Aktivität des Cellulaseenzymen beträgt darnach  $k = 2,07 \text{ cm}^3/\text{g} \cdot \text{sec}$ , eine Größe, die sowohl vom Molekulargewicht wie auch der Substrat- und der Enzymkonzentration unabhängig ist. Die spezifische und molekulare Aktivität des Enzyms wurden in internationalen Einheiten bestimmt.

The kinetics of the hydrolysis of sodium carboxymethylcellulose under the catalyzing effect of a cellulase enzyme was investigated by means of a viscometric method applying the inferences of a theory<sup>20</sup> set up previously. The activity of the cellulase enzyme was shown to be  $k = 2,07 \text{ cm}^3/\text{g} \cdot \text{sec}$  and independent both of the molecular weight and concentration of the enzyme. The specific and molecular activities of the enzyme were determined in international units.

## Einführung

Die enzymatische Hydrolyse der Cellulose wird durch einen Cellulase-enzym-Komplex<sup>1</sup> bewirkt. Die Wirkung des letzteren kann entsprechend dem folgenden allgemeinen Schema dargestellt werden:

\* Gegenwärtige Adresse: Institut für Biochemie der Bulgarischen Akademie der Wissenschaften, Sofia.

<sup>1</sup> V. I. Bilai, Biologisch aktive Substanzen mikroskopischer Pilze. Kiev: Nauk. Dumka 1965.

Hochpolymere Cellulose  $\rightarrow$  Cellulose mittleren Polymerisationsgrades  $\rightarrow$  Cellodextrine  $\rightarrow$  Oligosaccharide  $\rightarrow$  Cellobiose  $\rightarrow$  Glucose<sup>2</sup>.

Die Charakterisierung der einzelnen Cellulasetypen geht von ihrer Wirkung auf die einzelnen Cellulosesubstrate aus: natürliche (Baumwollfasern, gequollene Cellulose, Cellophan usw.) und lösliche Derivate der Cellulose (Na-CMC, Methylcellulose usw.). Demgemäß unterscheidet man zwei Cellulasetypen<sup>3, 4</sup>, deren Enzymaktivität nach den beiden folgenden grundlegenden Methoden bestimmt wird:

1. Bestimmung der Molekulargewichtsabnahme des unlöslichen Substrats als Folge der Hydrolyse durch die Cellulase (zufällige oder definierte Spaltung der  $\beta$ -1,4-glykosidischen Bindungen im Cellulosemolekül). Diese Bestimmungen werden meist gravimetrisch oder kolorimetrisch ausgeführt, und zwar direkt<sup>5</sup> oder indirekt<sup>6</sup>. Die Genauigkeit dieser Methode leidet unter den Schwierigkeiten bei der Abtrennung nicht-abgebauter Cellulose, von Salzen, Bakterienzellen und Pilzmycelien<sup>7</sup>.

2. Bestimmung der bei der Hydrolyse der Cellulose<sup>8, 9</sup> oder löslicher Cellulosesubstrate<sup>7, 10, 11</sup> entstandenen Menge reduzierender Zucker im Reaktionsmedium. Die Verfolgung der Cellulosehydrolyse mit Hilfe jodometrischer oder permanganometrischer Methoden leidet unter folgenden Nachteilen<sup>7, 12, 13</sup>:

a) Die gespaltenen Bindungen werden nur teilweise erfaßt, d. h. nur Mono-, Di- und Oligosaccharide können bestimmt werden.

b) Es ist nicht möglich, den Beginn des Abbaues in präziser reaktionskinetischer Weise zu erfassen.

c) Bei Vorliegen eines unlöslichen Substrates wird das Sediment vernachlässigt.

d) Derartige Bestimmungen sind nicht sehr empfindlich.

Der allgemeine Verlauf der Hydrolyse kann nur dann erfaßt werden, wenn das Substratmolekül von seinem Ende her abgebaut wird (Exo-

<sup>2</sup> E. Courtois und Bui Khas Diep, Ann. pharm. franç. **23**, 533 (1965).

<sup>3</sup> G. Halliwell, in: Adv. in enzym. hydroly. cell., Ed. E. Reese, Pergamon Press, 1963, p. 71.

<sup>4</sup> D. Whitaker, *ibid.*, p. 51.

<sup>5</sup> G. Halliwell, Biochem. J. **68**, 605 (1958).

<sup>6</sup> G. Halliwell, Biochem. J. **74**, 457 (1960).

<sup>7</sup> M. I. Verhovtseva, Microbiology **34**, 430 (1965).

<sup>8</sup> P. Karrer, P. Schubert und W. Wehrli, Helv. chim. Acta **8**, 797 (1925).

<sup>9</sup> W. Grassmann, R. Stadler und R. Bender, Ann. Chemie **502**, 20 (1933).

<sup>10</sup> L. T. Loghinova und J. Tashpoulatov, Microbiology **34**, 258 (1965).

<sup>11</sup> R. V. Fenixova und I. V. Oulezlo, Appl. Biochem. Microbiol. **1**, 406 (1965).

<sup>12</sup> E. Husemann und R. Lötterle, Makromol. Chem. **4**, 278 (1950).

<sup>13</sup> E. Husemann, E. Loes und R. Lötterle, *ibid.* **6**, 163 (1951).

hydrolyse). Dies ist jedoch bei Cellulose<sup>4</sup> nicht der Fall, denn gerade bei ihr erfolgt ein statistischer Abbau der Bindungen innerhalb der Kette.

3. Bestimmung der Änderung der Viskosität löslicher Derivate der Cellulose unter der Einwirkung von Cellulase. Diese viskosimetrische Methode zeigt bei ihrer Anwendung, verglichen mit den oben beschriebenen Methoden, gewisse Vorteile, wie z. B. ihre gute Reproduzierbarkeit, genügende Empfindlichkeit sowie die Möglichkeit, mit ihrer Hilfe den Beginn der Reaktion zu erfassen und ihre Kinetik zu verfolgen<sup>12, 13</sup>.

Die viskosimetrische Methode zur Bestimmung der Cellulaseaktivität ist schon von mehreren Autoren angewandt worden<sup>7, 10-18</sup>.

In der Mehrzahl dieser Untersuchungen wurde die Einwirkung des Enzyms auf das Substrat zu einem willkürlich gewählten Zeitpunkt unterbrochen und hierauf die Enzymaktivität mit Hilfe der beobachteten Abnahme der spezifischen Viskosität abgeschätzt.

Husemann und Mitarbeiter<sup>12, 13</sup> verfolgten als erste kinetisch den Abbau der Methylcellulose unter der Einwirkung des Cellulaseenzym.

Einen gewissen Beitrag zur theoretischen Diskussion der Hydrolysenkinetik des Na-CMC-Cellulasesystems haben auch Frederick und Mitarbeiter<sup>17</sup> geleistet; die von diesen Autoren definierte Cellulaseeinheit erscheint jedoch vollkommen willkürlich.

Darüber hinaus ist in einigen der vorerwähnten Arbeiten, die sich der viskosimetrischen Methode bedienen, die von der Internationalen Enzymkommission geforderte Temperatur von 25° C für die Enzym-Substrat-Reaktion nicht eingehalten worden.

In der vorangehenden Arbeit<sup>20</sup> haben wir eine Theorie zur Verfolgung bestimmter Hydrolysereaktionen aufgestellt, welche eine Bestimmung der an ihnen teilnehmenden Enzyme gestattet. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Theorie durch Bestimmung der Aktivität der Cellulase gegenüber einem Na-CMC-Substrat geprüft.

### Ausgangssubstanzen und Meßmethode

1. *Substrat*: Durch die Untersuchungen von Reese und Mitarb.<sup>21</sup> und von Holden und Tracey<sup>22</sup> ist gesichert worden, daß bereits minimale Cellulase-

<sup>14</sup> Chr. van Sumere, Naturwiss. **40**, 582 (1953).

<sup>15</sup> M. A. A. Yonk, L. W. McElroy, R. T. Berg, Canad. J. Biochem. **35**, 181 (1957).

<sup>16</sup> A. M. Silva, Pharm. acta Helv. **33**, 571 (1958); Chem Zbl. **1962**, 888.

<sup>17</sup> A. Fredrik, V. Eriksson und Sv. Lindvall, J. Pharmacy and Pharmacol. **11**, 747 (1959).

<sup>18</sup> M. Ammann, Phytopathol. Z. **18**, 416 (1952); Chem. Zbl. **1952**, 6707.

<sup>19</sup> Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry, Report. Oxford-London-New York-Paris: Pergamon Press 1961.

<sup>20</sup> M. Tschetkarov und D. Koleff, Mh. Chem. **98**, 1908 (1967).

<sup>21</sup> E. T. Reese, R. G. H. Sin und H. S. Levinson, J. Bacteriol. **59**, 485 (1950).

<sup>22</sup> M. Holden und M. V. Tracey, Biochem. J. **47**, 407 (1950).

mengen viskosimetrisch nachweisbar sind, wenn man Na-*CMC* als Substrat verwendet. Wir haben alle unsere Untersuchungen an dem Na-*CMC*-Präparat Tylose C<sup>®</sup>\* ausgeführt und die folgenden Arten mit verschiedenem mittlerem Molekulargewicht ( $\bar{M}$ ) und mittlerem Polymerisationsgrad verwendet ( $\bar{n}$ ):

Tylose-C-Art	$\bar{M}$	$\bar{n}$
10	30 000	140
30	50 000	230
1000	140 000	640
6000	200 000	900

Aus den genannten Tylose-C-Arten wurden Lösungen der folgenden Konzentration [ $S$ ] (mg/ml)

0,5      1,0      1,5      2,0      2,5      3,0      4,0      5,0

hergestellt, indem man die entsprechenden Einwaagen in dem notwendigen Volumen eines Acetatpuffers vom pH 4,5 löste. Nach Stehenlassen über Nacht trennte man unlösliche Celluloseanteile durch Zentrifugieren (20 Min., 5000 UpM) ab und bewahrte die so gewonnenen Lösungen im Kühlschrank bei 0—4° auf.

2. *Enzym*: Als Enzym verwendeten wir das Präparat Luizym<sup>®\*\*</sup> mit einem Gehalt von 118 Cellulaseeinheiten nach *Grassmann*. Lösungen verschiedener Konzentrationen [ $E$ ] (mg/ml) wurden daraus hergestellt, indem man entsprechende Einwaagen in Acetatpuffer vom pH 4,5 löste, 30 Min. schüttelte und darnach 20 Min. bei 5000 UpM zentrifugierte. Die Lösungen wurden im Kühlschrank bei 0—4° aufbewahrt.

3. *Meßmethode*: Alle viskosimetrischen Messungen wurden mit einem Höppler-Viskosimeter ausgeführt und die nach<sup>19</sup> optimale Temperatur von 25° C aufrechterhalten. Die Enzymreaktion wurde vom Zeitpunkt der Vereinigung der Enzym—Substrat-Lösungen an durch Feststellung der Viskositätsabnahme verfolgt.

## Ergebnisse und Diskussion

Zur Bestimmung der Konstanten  $K$  und  $a$  der *Mark—Houwinkschen* Gleichung

$$[\eta] = K \cdot M^a \quad (1)$$

für den Fall der Na-*CMC* wurde die spezifische Viskosität  $\eta_{sp}$  der oben beschriebenen Lösungen der Konzentrationen [ $S$ ] gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 wiedergegeben. Man ersieht daraus, daß das 2. Glied auf der rechten Seite der Gleichung

$$\eta_{sp} = [\eta] [S] + B [S]^2 \quad (2)$$

\* Fa. Kalle & Co. AG., D-6202, Wiesbaden-Biebrich.

\*\* Fa. Luitpold-Werk, D-8 München 25, Zielstattstr. 9—15.

um so kleiner ist, je kleiner das Molekulargewicht des Substrats. Die Enzymkonzentration  $[S_0]$ , jenseits welcher die durch Gl. (2) ausgedrückte Abhängigkeit von der linearen in nennenswertem Ausmaß abzuweichen beginnt, ist für die verschiedenen Molgewichte verschieden. Eine näherungsweise Bestimmung ist auf folgendem Wege möglich: schreibt man (2) für die Enzymkonzentration  $[S_0]$  in der Form

$$\eta_{sp} = [\eta] [S_0] \left( 1 + \frac{B [S_0]}{[\eta]} \right) \quad (3)$$

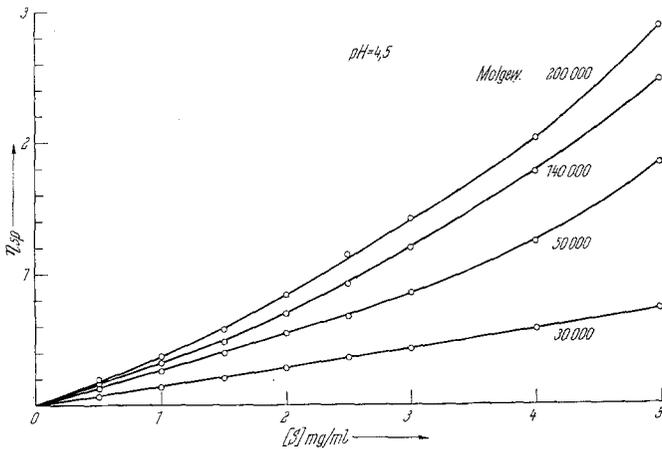


Abb. 1. Abhängigkeit der spezif. Viskosität  $\eta_{sp}$  von Na-CMC verschiedenen Molgewichts von der Konzentration  $[S]$

an, dann sollte die rechte Seite der Gleichung den Wert 0,25 nicht übersteigen, d. h.

$$[S_0] = \frac{[\eta]}{4B} \quad (4)$$

Bei Anwendung der Gl. (2) können wir uns in diesem Falle bei Konzentrationen  $[S] < [S_0]$  auf das 1. Glied der rechten Seite der Gleichung beschränken.

Nach Gl. (2) können wir aus der Viskositätszahl

$$Z_\eta = \frac{\eta_{sp}}{[S]} = [\eta] + B[S] \quad (5)$$

für die verschiedenen Molekulargewichte  $M$  den Koeffizienten  $B$  und durch Extrapolation die Grenzviskositätszahl ermitteln. Abb. 2 zeigt die für ein- und dasselbe Molekulargewicht erhaltenen Werte. Ausgehend von den

Werten  $[\eta]$  und  $M$  der Abb. 2 und durch Anwendung der Gl. (1) in ihrer logarithmischen Form

$$\log [\eta] = \log K + a \log M \tag{6}$$

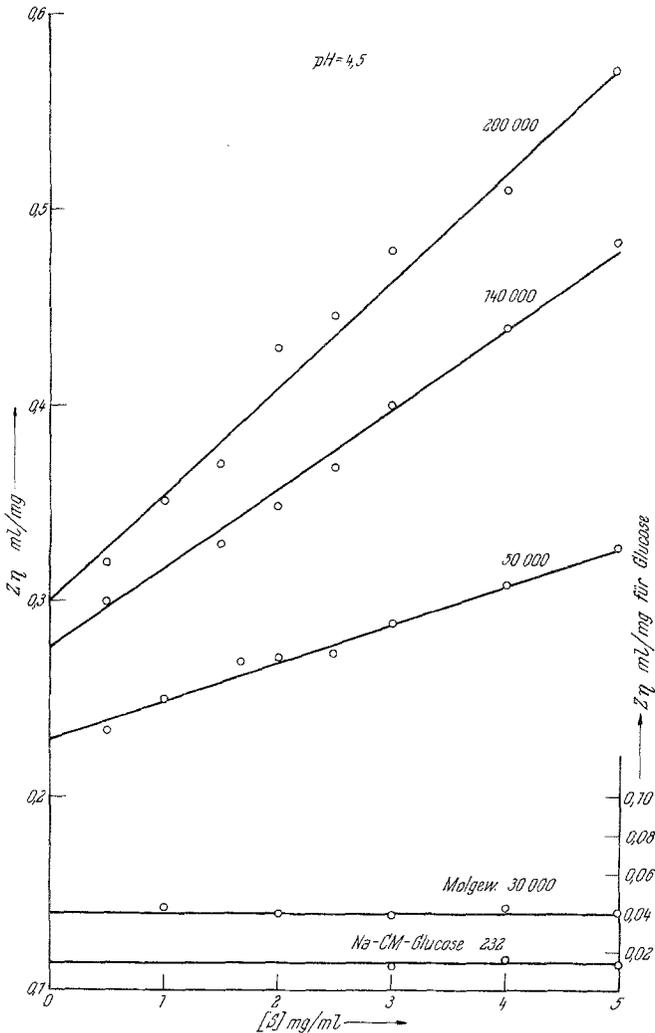


Abb. 2. Abhängigkeit der Viskositätszahl  $Z_{\eta}$  von Na-CMC verschiedenen Molekulargewichts von der Konzentration  $[S]$

kann man, wie Abb. 3 zeigt, die Werte  $K$  und  $a$  für Na-CMC bestimmen:

$$K = 0,00158 \quad a = 0,43 \tag{7}$$

Aus den Werten  $[\eta]$  und  $B$  lassen sich mit Hilfe der Gl. (4) auch die Grenzwerte der Substratkonzentration für die verschiedenen Molekulargewichte für den Gültigkeitsbereich der linearen Form von (2) berechnen. Diese Grenzwerte sind in Tab. 1 wiedergegeben.

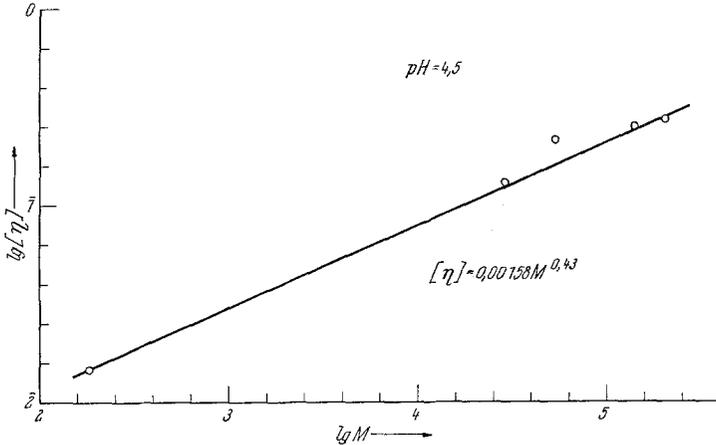


Abb. 3. Logarithm. Abhängigkeit der Grenzviskositätszahl  $[\eta]$  vom Molekulargewicht ( $M$ ) der Na-*CMC* und Na-*CM*-Glucose

Für die enzymatische Hydrolyse-reaktion der Na-*CMC* durch Cellulase wurde in allen Versuchen mit verschiedenen Molekulargewichten eine Substratkonzentration von  $[S] = 2$  mg/ml verwendet, die Konzentration  $[E]$  des Cellulaseenzym-Präparats jedoch zwischen  $[E] = 0,1$  und 2 mg/ml

Tabelle 1

Molekulargewicht	$[\eta]$	$B$	$[S_0]$ mg/ml
30 000	0,140	0,005	7
50 000	0,230	0,020	3
140 000	0,275	0,045	1,5
200 000	0,300	0,055	1,1

variiert. Die spezifische Viskosität  $\eta_{sp}$  wurde in Abhängigkeit von der Reaktionszeit  $t$  (0 bis 2 Std.) unter optimalen Bedingungen (pH 4,5, Temp. 25° C) bestimmt. Nach 24 Std. wurde noch einmal die Viskosität aller Lösungen gemessen; die daraus gewonnenen Molekulargewichte waren dann gleich dem von Natriumcarboxymethylglucose. Die Werte der  $\eta_{sp}$  für die verschiedenen Molekulargewichte ( $M$ ) der Substrate und die Enzymkonzentrationen  $[E]$  sind in den Abb. 4, 5, 6 und 7 (oben) wiedergegeben. Aus ihnen wurden eine spezifische Viskosität  $\eta'_{sp}$  und die Größe  $a$  wie folgt abgeleitet:

$$\eta'_{sp}(0) = \sqrt[a]{\eta_{sp}(0)}, \quad \eta'_{sp}(t) = \sqrt[a]{\eta_{sp}(t)}$$

$$\eta'_{sp}(\infty) = \sqrt[a]{\eta_{sp}(\infty)}$$

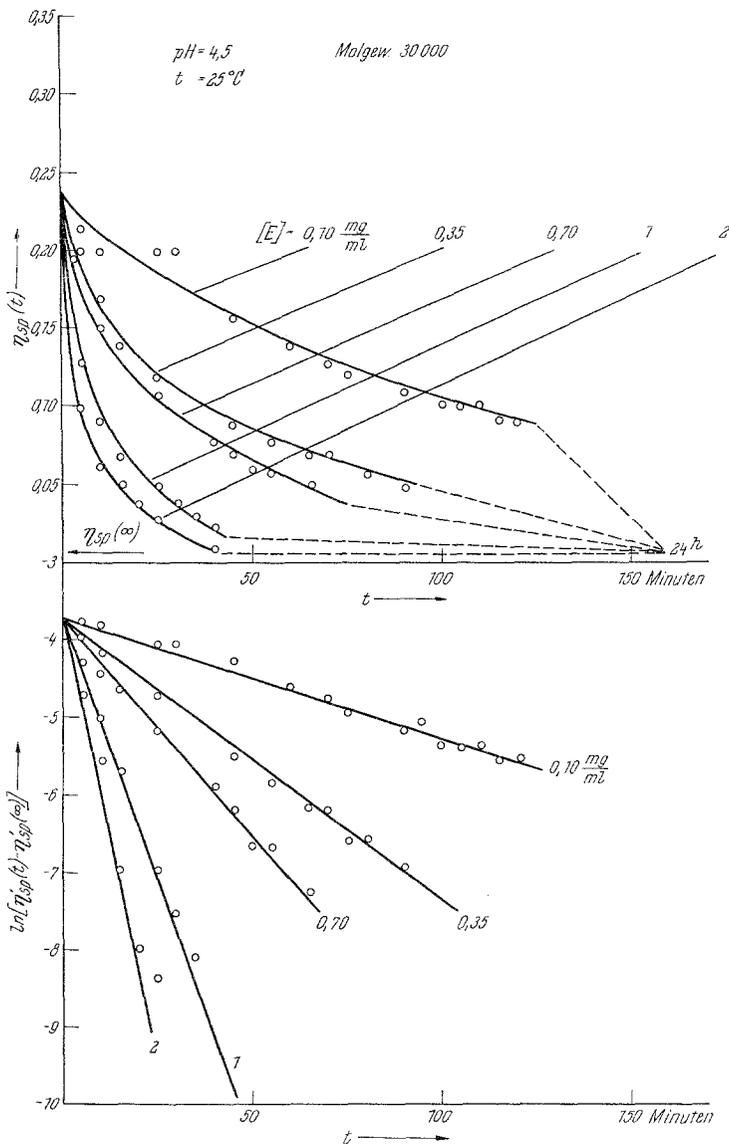


Abb. 4. oben: Abhängigkeit der spezif. Viskosität  $\eta_{sp}$  von der Reaktionsdauer  $t$  für die Reaktion zwischen Na-CMC (Molekulargewicht 30 000) und Cellulase bei verschiedenen Enzymkonzentrationen  $[E]$ ; unten: Logarithm. Darstellung der gleichen Abhängigkeit

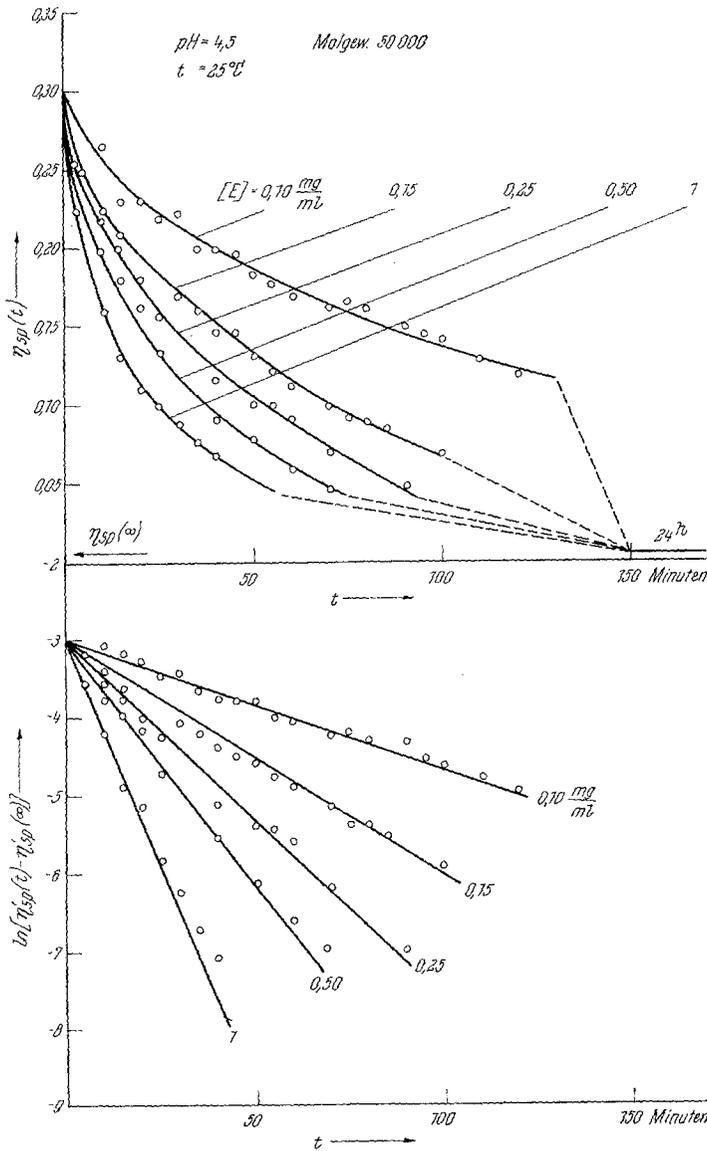


Abb. 5. Wie Abb. 4, jedoch für ein Molekulargewicht von 50 000

und, wie aus Gl. (14) der vorangehenden Arbeit<sup>20</sup> folgt, ist

$$\eta'_{sp}(t) - \eta'_{sp}(\infty) = [\eta'_{sp}(0) - \eta'_{sp}(\infty)] e^{-k[E]t} \tag{8}$$

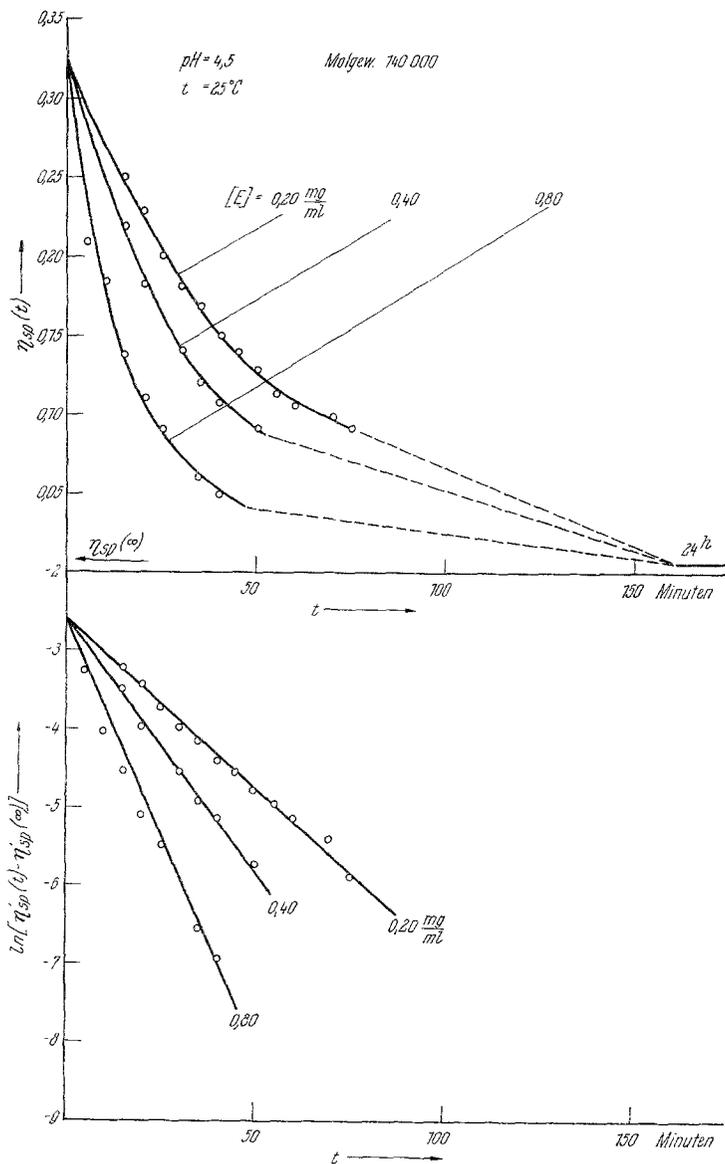


Abb. 6. Wie Abb. 4, jedoch für ein Molekulargewicht von 140 000

Aus der in den Abb. 4, 5, 6 und 7 (unten) für die verschiedenen Molekulargewichte und Enzymkonzentrationen aufgetragenen logarithmischen Form dieser Abhängigkeit

$$\ln [\eta'_{sp}(t) - \eta'_{sp}(\infty)] = [\eta'_{sp}(0) - \eta'_{sp}(\infty)] - k[E]t \quad (9)$$

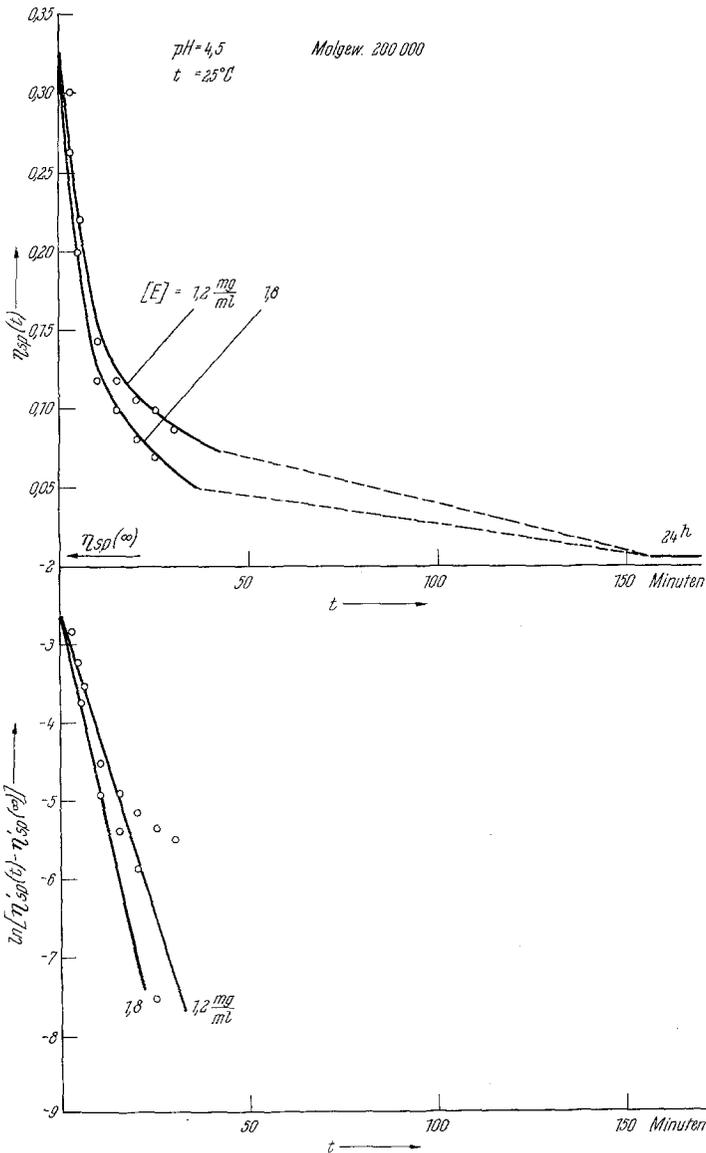


Abb. 7. Wie Abb. 4, jedoch für ein Molekulargewicht von 200 000

wurde der Exponent  $k[E]$  bestimmt. Er ergibt sich als lineare Funktion der Enzymkonzentration  $[E]$  und ist vom Molekulargewicht ( $M$ ) des Substrats unabhängig (Abb. 8). Die Neigung der so erhaltenen Geraden

gibt die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante des Substratabbaus mit dem Wert

$$k = 2,07 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ sec}^{-1}.$$

Diese Konstante hängt von der Enzymkonzentration nicht ab und gibt die Wirkung einer Masseneinheit des Enzyms in einer Volumseinheit der Lösung während einer Zeiteinheit an. Nennen wir  $1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  1 *Ferm*<sup>20</sup>, dann ist die Cellulaseaktivität gegenüber Na-CMC als Substrat

$$k = 2,07 \text{ Ferm bei pH 4,5 und } t = 25^\circ.$$

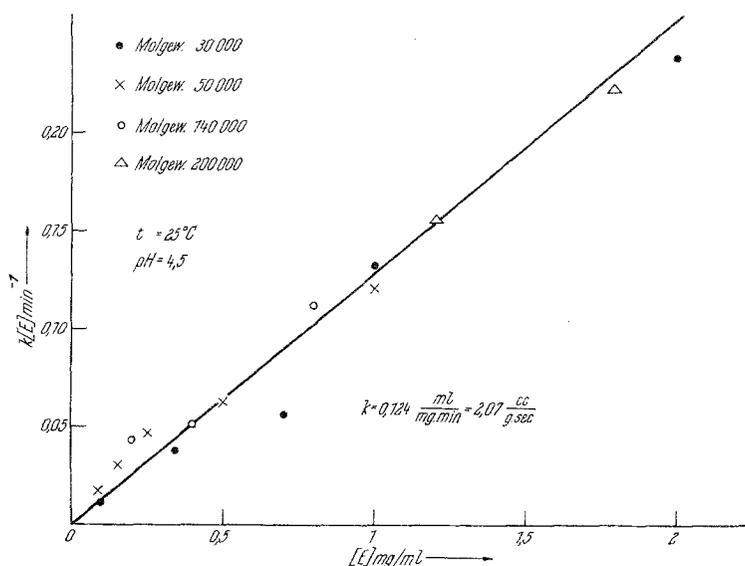


Abb. 8. Abhängigkeit des Kehrwerts der Relaxationszeit ( $1/\tau = k[E]$ ) von der Konzentration  $[E]$  des Enzyms für verschiedene Molekulargewichte der Na-CMC

Für eine gegebene Reaktion wird  $k$  außer vom pH und der Temperatur ohne Zweifel auch noch von Inhibitoren und Aktivatoren abhängen.

In Übereinstimmung mit dem internationalen Bestimmungsverfahren<sup>19</sup> kann die Anfangsaktivität des Enzyms

$$v(0) = k M_0 [E] \quad (10)$$

aus Gl. (18) der vorangehenden Arbeit<sup>20</sup> in Einheiten  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$  für verschiedene Molekulargewichte des Substrats bei einer gegebenen Enzymkonzentration bestimmt werden. In Tab. 2 sind die Anfangsenzymaktivitäten für die von uns verwendeten Molekulargewichte für  $1 \mu\text{mol}$  Substrat und die Enzymkonzentration  $[E]$  ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) angeführt. Die letzte Kolonne gibt außerdem die Werte der spezifischen Anfangsaktivität

$$\frac{v(0)}{[E]} = k \cdot M_0$$

nach Gl. (19) von <sup>20</sup> in den Einheiten (cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>) an. Diese Größe beschreibt den Abbau von 1 μmol Substrat in der Volumseinheit der Lösung pro Zeiteinheit.

Tabelle 2

$\frac{[E] \text{ (g/cm}^3\text{)}}{M_0 \text{ (g)}}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$10 \cdot 10^{-4}$	$20 \cdot 10^{-4}$	$\frac{v(0)}{[E]}$
0,03	$3,73 \cdot 10^{-4}$	$18,3 \cdot 10^{-4}$	$37,3 \cdot 10^{-4}$	$66,6 \cdot 10^{-4}$	$3,72 \cdot 10^{-4}$
0,05	$6,20 \cdot 10^{-4}$	$31,0 \cdot 10^{-4}$	$62,0 \cdot 10^{-4}$	$128,0 \cdot 10^{-4}$	$6,20 \cdot 10^{-4}$
0,14	$17,40 \cdot 10^{-4}$	$86,8 \cdot 10^{-4}$	$174,0 \cdot 10^{-4}$	$348,0 \cdot 10^{-4}$	$17,40 \cdot 10^{-4}$
0,20	$24,80 \cdot 10^{-4}$	$148,0 \cdot 10^{-4}$	$248,0 \cdot 10^{-4}$	$496,0 \cdot 10^{-4}$	$24,80 \cdot 10^{-4}$

Nach Gl. (20) in <sup>20</sup> ist die Anfangsaktivität der Cellulose

$$Z(0) = k [E] n(0),$$

worin  $n(0) = \frac{M_0}{m}$  das Verhältnis der Molekulargewichte des Polymeren und des Elementarbausteines\* darstellt. Diese Aktivität nimmt selbstverständlich verschiedene Werte für verschiedene Molekulargewichte und Enzymkonzentrationen an. Tab. 3 gibt diese Werte für Einheiten min<sup>-1</sup> (nach<sup>19</sup>) und die von uns verwendeten Molekulargewichte (s. Tab. 1),  $m = 232$ , und die Enzymkonzentrationen  $[E]$  wieder.

Tabelle 3

$\frac{[E] \text{ mg/ml}}{n(0)}$	0,1	0,5	1	2	$kn(0)$
129	1,60	8,00	16,0	32,0	267
216	2,68	13,40	26,8	53,6	447
605	7,50	37,50	75,0	150,0	1250
863	10,70	53,50	107,0	214,0	1790

Die letzte Kolonne enthält die Werte der spezifischen molekularen Anfangsaktivität

$$\frac{Z(0)}{[E]} = k n(0)$$

\* Die auf diese Weise bestimmten Polymerisationsgrade waren kleiner als die von der Firma angegebenen Durchschnittswerte.

nach Gl. (21) von  $^{20} = \text{Einheiten (cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ sec}^{-1})$ . Diese Aktivität charakterisiert die von der Masseneinheit des Enzyms in der Volumseinheit der Lösung in der Zeiteinheit angegriffenen Bindungen des Substrats.

#### Danksagung

Für die Überlassung der Enzym- und Substratpräparate, mit deren Hilfe die vorliegende Arbeit ausgeführt wurde, dankt *D. K.* auch an dieser Stelle herzlichst den Firmen Luitpold-Werk, München, und Kalle AG, Wiesbaden-Biebrich.