

**Viskosimetrische Bestimmung der Hemmkonstante ( $K_I$ ) von  
 $\beta$ -1,4-Glucan-4-glucanohydrolase (EC 3.2.1.4)—  
[ $C_x$ -Cellulasen-Enzyme] in Anwesenheit  
eines kompetitiven Hemmstoffs Lactose**

Von

**M. Tschetkarov und D. Koleff**

Fakultät für Physik der Universität Sofia und Institut für Biochemie  
der Bulgarischen Akademie der Wissenschaften, Sofia, Bulgarien

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 24. Juli 1968)

Nach der entwickelten Theorie<sup>5</sup> bestimmt man viskosimetrisch die Hemmkonstante  $K_I = 2,78 \cdot 10^{-2}$  mMol/ml der hydrolytischen Reaktion der Natriumcarboxymethylcellulose (Na-CMC) unter der katalytischen Wirkung von  $C_x$ -Cellulasen-enzym [(EC 3.2.1.4), ( $\beta$ -1,4-Glucan-4-glucanohydrolase)], aus *Aspergillus oryzae* isoliert, und unter der Hemmwirkung des kompetitiven Hemmstoffs Lactose.

*Viscosimetric Determination of the Inhibition Constant ( $K_I$ ) of  $\beta$ -1,4-Glucan-4-Glucano Hydrolase (EC 3.2.1.4)-[ $C_x$ -Cellulase Enzyme] in Presence of a Competitive Inhibitor (Lactose)*

According to a recently developed theory<sup>5</sup>, an inhibition constant  $K_I = 2,78 \cdot 10^{-2}$  mMol/ml was determined viscosimetrically for the hydrolase reaction of sodium carboxymethyl cellulose (Na-CMC) with  $C_x$ -cellulase enzyme (EC 3.2.1.4,  $\beta$ -1,4-glucan-4-glucanohydrolase), isolated from *Aspergillus oryzae*. Lactose was used as a competitive inhibitor.

### Einführung

Die Beeinflussung des cellulolytischen Enzymkomplexes (der sog. Cellulasen) durch chemische und physikalische Faktoren sowie die Hemmung durch einige in den Pflanzen vorhandene Naturstoffe wurde ein-

gehend von *Mandels* und *Reese*<sup>1</sup> resümiert. Es wurde der wesentliche Unterschied in der Nachgiebigkeit der Cellulaseenzyme verschiedenen Ursprungs, sowie der einzelnen Komponenten eines Cellulase-Komplexes gegenüber verschiedenartigen Hemmstoffen hervorgehoben.

Da eine Theorie, die die Bestimmung der entsprechenden Konstanten ermöglicht, fehlte, wurde die Kinetik der Hemmung von  $C_x$ -Cellulasen gegenüber verschiedenen Hemmstoffen bis jetzt viskosimetrisch nicht erforscht. Die viskosimetrische Methode wurde ausschließlich für die qualitative Bewertung von Hemmwirkungen angewendet (z. B. die Hemmwirkungen durch Methylcellulose<sup>2, 3</sup>, Lactose<sup>4</sup> u. a.).

In einer vorangehenden Arbeit<sup>5</sup> stellten wir eine Theorie auf zur viskosimetrischen Bestimmung der Hemmkonstante ( $K_I$ ) bei Enzymreaktionen, an denen hochmolekulare Verbindungen beteiligt sind und die nach Art einer reversiblen, kompetitiven Hemmung verlaufen.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Theorie nachgeprüft, indem die Hemmkonstante des die Hydrolyse des Na-CMC katalysierenden Enzyms  $C_x$ -Cellulase (EC 3.2.1.4,  $\beta$ -1,4-Glucan-4-Glucanohydrolase) in Anwesenheit des in der Literatur<sup>1, 4</sup> bekannten kompetitiven Hemmstoffs Lactose bestimmt wurde.

#### Ausgangssubstanzen und Meßmethode

1. Substrat: Es wurde Na-CMC (Präparat Tylose C@\*) mit einem mittleren Molekulargewicht von 140 000 verwendet. Die Substratlösung wurde in einer Konzentration von 1,8 mg/ml durch Auflösen von Na-CMC in Acetatpuffer von pH 4,5 hergestellt.

2. Enzym: Als  $C_x$ -Cellulaseenzym wurde das Präparat Luizym@\*\* angewandt, das zu diesem Zwecke speziell gereinigt und uns von der Fa. Luitpold-Werk, München, überlassen wurde. Die Enzymlösung wurde in einer Konzentration von 0,16 mg/ml durch Auflösen von gefriertrockenem Enzym in Acetatpuffer von pH 4,5 hergestellt.

3. Hemmstoff: Als Hemmstoff wurde das Disaccharid Lactose (Molekulargewicht 342,3) in Konzentrationen von 1 : 5 und 10 mg/ml verwendet.

4. Meßmethode: Alle viskosimetrischen Messungen wurden mit einem Höppler-Viskosimeter\*\*\* bei 25° C ausgeführt, Meßküvette 0,01 und Be-

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

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

\*\*\* VEB Prüfgeräte, Medingen-Dresden.

<sup>1</sup> *M. Mandels* und *E. Reese*, Enzym. hydrolyt. cellul., Ed. E. Reese, Pergamon Press, p. 115, 1963.

<sup>2</sup> *W. Gilligan* und *E. Reese*, Canad. J. Microbiol. **1**, 90 (1954).

<sup>3</sup> *E. Reese* und *M. Mandels*, Res. Report, Pioneering Res. Div., Quartermaster Res. and Develop. Center, Natick (Mass.), Microbiology Series, Nr. 17 (1957).

<sup>4</sup> *L. Enebo*, Studies in cellulose decomposition by an anaerobic thermophilic bacterium and two associated non-cellulolytic species, Stockholm, Sweden, Victor Petersons Bokindustri Aktiebolag, 1—125 (1954).

<sup>5</sup> *M. Tschetkarov* und *D. Koleff*, Mh. Chem. **100**, 1195 (1969).

lastung 10 g/cm<sup>2</sup>. Der volle Meßgang des Apparats von 30 mm wurde mit Hilfe eines Sekundenzählers mit 0,2 Sek. Genauigkeit abgelesen. Die Enzymlösung, mit dem Hemmstoff vermischt, wurde 10 Min. nach Beginn der Vermischung der Substratlösung hinzugefügt. Die Enzymreaktion wurde in regelmäßigen Zeitintervallen (jede 2,5 Min.) mittels der Viskositätabnahme verfolgt.

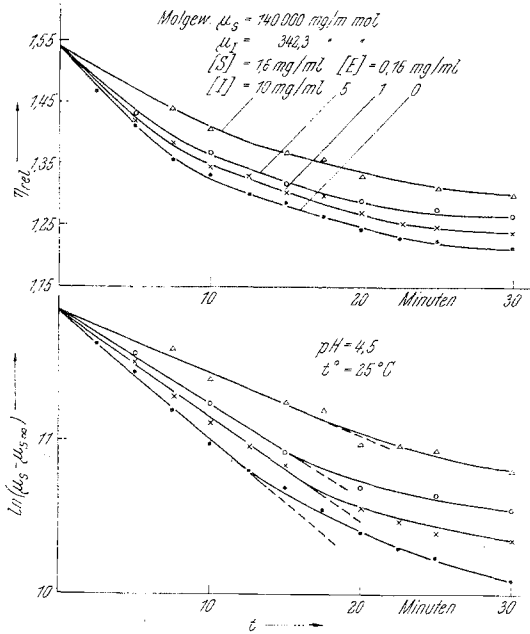


Abb. 1. Abhängigkeit von  $\eta_{rel}$  und  $\ln(\mu_s - \mu_{s\infty})$  von der Reaktionsdauer  $t$  für die Reaktion zwischen Na-CMC (Molgewicht 140 000) und  $C_x$ -Cellulaseenzym in Anwesenheit des kompetitiven Hemmstoffs Lactose (Molgewicht 342,3) bei verschiedener Hemmstoffkonzentration  $[I]$

### Ergebnisse und Diskussion

Zur Bestimmung des Molekulargewichts des sich abbauenden Substrats (Na-CMC) unter der katalytischen Wirkung von  $C_x$ -Cellulaseenzyme und in Anwesenheit des kompetitiven Hemmstoffs Lactose<sup>1, 4</sup> wurde in jedem Zeitpunkt der Enzymreaktion die Abhängigkeit<sup>6</sup>

$$\mu_s = \sqrt[n]{\frac{a(\sqrt{\eta_{rel}} - 1)}{K[S]}} \quad (1)$$

benutzt, worin die Werte der Konstanten  $K$  und  $a$  früher<sup>6</sup> ermittelt wurden:

$$K = 0,00158 \text{ und } a = 0,43.$$

Auf diese Weise, indem die relative Viskosität  $\eta_{\text{rel}}$  in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer  $t$  (0 — 30 Min.) bei optimalen Bedingungen (pH = 4,5; 25° C) durch Relation (1) gemessen wurde, wurde das Molekulargewicht  $\mu_S$  des sich abbauenden Substrats bestimmt.

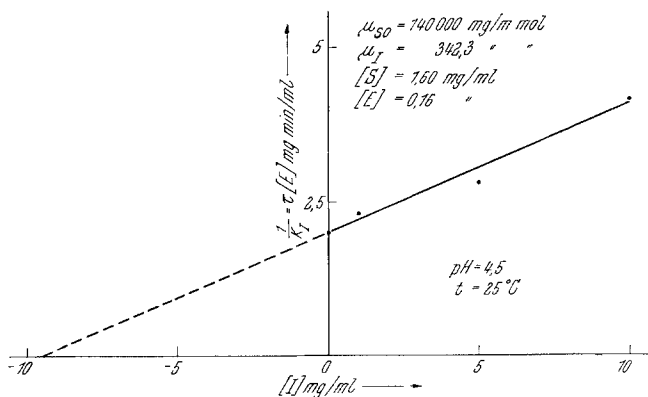


Abb. 2. Änderung des Produktenwertes der Relaxationsdauer und der Enzymkonzentration  $\tau [E]$  mit der Hemmstoffkonzentration  $[I]$

Ersetzte man die so ermittelten Werte von  $\mu_S$  von (1) in der Gl. (16)<sup>6</sup>, die den Beginn der gehemmten Enzymreaktion beschreibt

$$\mu_S - \mu_{S\infty} = (\mu_{S0} - \mu_{S\infty}) e^{-k_I [E] t}, \quad (2)$$

so kann man die Kinetik der von der Lactose gehemmten Enzym—Substrat-Reaktion in jedem Zeitpunkt  $t$  verfolgen. Relation (2) kann man in logarithmischer Form ausdrücken, wie das in einer früheren Arbeit<sup>7</sup> getan wurde.

In Abb. 1 sind die experimentell ermittelten Werte von  $\eta_{\text{rel}}$  und  $\ln(\mu_S - \mu_{S\infty})$  in Abhängigkeit von der Reaktionszeit  $t$  eingetragen.

Aus der graphischen Darstellung der Abb. 1 wurden die Neigungen bestimmt, d. h. die Zeitspannen der Relaxation  $\tau = 1/k_I [E]$  bei unveränderter Enzymkonzentration  $[E]$  und veränderlicher Konzentration des Hemmstoffs. In Abb. 2 ist die Abhängigkeit  $1/k_I = \tau [E]$  in Beziehung von der Konzentration  $[I]$  des angewandten Hemmstoffs

$$\frac{1}{k_I} = \frac{1}{k} \left( 1 + \frac{[I]}{K_I \mu_I} \right) \quad (3)$$

<sup>6</sup> M. Tschetkarov und D. Koleff, Mh. Chem. **100**, 986 (1969).

<sup>7</sup> M. Tschetkarov, D. Koleff und S. Banikova, Mh. Chem. **98**, 1926 (1967).

laut Relation (17)<sup>5</sup> eingetragen. Aus der Neigung der Geraden in Abb. 2 wird die Hemmkonstante

$$K_I = - \frac{[I]_0}{\mu_I} = 2,78 \cdot 10^{-2} \text{ mmol/ml}$$

in Molarkonzentration bestimmt.

Für die Überlassung des extra angefertigten Enzympräparats, mit dessen Hilfe die vorliegende Arbeit ausgeführt wurde, danken die Verfasser auch an dieser Stelle herzlichst der Fa. Luitpold-Werk, München.