



УДК 577.154.33.02

КИНЕТИКА ДЕЙСТВИЯ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
ИЗ *GEOTRIHUM CANDIDUM*ВИСКОЗИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КИНЕТИКИ ГИДРОЛИЗА
КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Рабинович М. Л., Клесов А. А., Березин И. В.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
кафедра химической энзимологии

Проведено изучение кинетики гидролиза растворимой карбоксиметилцеллюлозы (степень замещения 0,55, степень полимеризации 350) под действием целлюлазной системы из *Geotrihum candidum*. Кинетику ферментативного действия изучали при помощи вискозиметрического метода, основанного на регистрации начальной скорости уменьшения вязкости раствора полимерного субстрата. Метод позволяет оценивать по вискозиметрическим данным абсолютную эндоглюканазную активность ферментного препарата (в мкмоль расщепляемых гликозидных связей в 1 мин). Определенная таким способом удельная эндоглюканазная активность исследованного препарата составила 120 ед/г, или 2 мк катал/г при 25°, рН 4,5. Показано, что ферментативный гидролиз карбоксиметилцеллюлозы протекает в соответствии со схемой Михаэлиса с $K_m = (0,45-1,8) \cdot 10^{-4}$ М. Обсуждается возможность использования описанного вискозиметрического метода для изучения кинетики действия эндополимераз.

Вискозиметрический метод применяется для определения относительной активности целлюлаз из различных источников (см., например, [1—4]). Метод состоит в наблюдении за уменьшением вязкости водных растворов эфиров целлюлозы под действием целлюлолитических ферментов. Несомненным преимуществом этого метода по сравнению с непосредственным титрованием альдегидных групп, образующихся в процессе ферментативного гидролиза целлюлозы, заключаются в быстроте и простоте его проведения. В случае же селективного определения активности эндоглюканазной компоненты целлюлазного комплекса в присутствии экзоглюканазы и β -глюкозидазы вискозиметрия вообще является единственным приемлемым методом.

Вместе с тем изучение кинетики и механизма действия целлюлаз с помощью вискозиметрического метода — весьма трудная задача, так как последний дает лишь косвенную информацию о проходящей в системе гидролитической реакции. В этой связи в ряде работ [5—10] на основании общетеоретических предпосылок были развиты подходы, позволившие связать изменение регистрируемой вязкости со скоростью накопления альдегидных групп в процессе гидролиза водорастворимого эфира целлюлозы под действием эндоглюканазы. Общим недостатком предложенных в работах [5—10] методов является необходимость математической обработки кривой уменьшения вязкости реакционной смеси во времени, для чего приходится вводить эмпирические параметры с неясным физическим

смыслом, к тому же существенно усложняющие расчет скорости ферментативной реакции из данных эксперимента.

Между тем существует принципиальная возможность определения начальной скорости ферментативной реакции на основе начальной скорости уменьшения вязкости раствора полимера под действием эндофермента. Такой подход представляется более оправданным по нескольким причинам. Во-первых, допущения, сделанные при выводе необходимых уравнений, наиболее строго выполняются лишь в начальные моменты реакции. Во-вторых, при действии ферментной системы, содержащей помимо эндоглюканазы также ферменты экзоглюканазного действия, влияние последних меньше проявляется именно в начальный период гидролиза полимерного субстрата. В-третьих, информация, получаемая из вискозиметрических данных в начальный момент реакции, относится к гидролизу наиболее чувствительных к действию эндоглюканазы участков полимера.

Настоящая работа посвящена изучению кинетики действия целлюлазного комплекса из *Geotrichum candidum* на водорастворимую натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (СМ-целлюлоза) с помощью вискозиметрического метода, основанного на регистрации начальных скоростей уменьшения относительной вязкости.

Теоретическая часть. Скорость ферментативного гидролиза раствора полимерного субстрата с весовой концентрацией c на начальных стадиях процесса действия эндополимеразы можно представить в виде

$$v = \frac{d}{dt} \left(\frac{c}{M} \right), \text{ или } v = c \frac{d(1/M)}{dt}, \quad (1)$$

где M — текущий среднечисловой молекулярный вес субстрата [5]. Молекулярный вес связан с характеристической вязкостью раствора полимера уравнением Марка — Хоувинка:

$$[\eta] = AM^x, \text{ или } \ln [\eta] = \ln A + x \ln M, \quad (2)$$

где A и x — параметры, зависящие от характера взаимодействия полимер—растворитель. Молекулярный вес, входящий в это уравнение, является, вообще говоря, средневискозиметрическим, а не среднечисловым. Однако при наличии серии образцов полимера с различными молекулярными весами, но одинаковой формой кривой молекулярно-вещного распределения средневискозиметрические веса отличаются от среднечисловых лишь постоянным множителем.

Считая, что на начальных стадиях действия эндополимеразы форма кривой молекулярно-вещного распределения субстрата не изменяется (это условие должно, очевидно, выполняться при деструкции полимера по механизму беспорядочной атаки), продифференцируем логарифмическую форму уравнения (2) во времени реакции:

$$\frac{d \ln [\eta]}{dt} = x \frac{d \ln M}{dt}. \quad (3)$$

Выражение (3) нетрудно преобразовать к виду

$$\frac{d \ln [\eta]}{dt} = -x \frac{d \ln (1/M)}{dt}, \text{ или } \frac{1}{[\eta]} \frac{d [\eta]}{dt} = -xM \frac{d(1/M)}{dt}. \quad (4)$$

Комбинируя (1) и (4), получим следующее выражение для скорости ферментативного гидролиза полимера по механизму беспорядочной атаки:

$$v = -\frac{c}{xM[\eta]} \frac{d [\eta]}{dt}. \quad (5)$$

Для определения с помощью этого выражения скорости ферментативного процесса в момент времени t требуется знать три переменных величины: характеристическую вязкость, скорость ее изменения во времени и молекулярный вес. На практике чаще требуется определить начальную скорость ферментативной реакции (v_0), служащую мерой ферментативной

активности. Ее нахождение с помощью выражения (5) существенно упрощается и фактически сводится к определению начальной скорости уменьшения характеристической вязкости, так как величины $[\eta]_0$ и M_0 относятся к исходному полимеру и определяются независимым путем.

Практически удобнее измерять не характеристическую, а относительную вязкость раствора ($\eta_{\text{отн}}$), которая функционально связана с его весовой концентрацией и характеристической вязкостью. Для ряда полимеров в широком интервале концентраций эта связь выражается уравнением Гесса — Филиппова [11]:

$$\eta_{\text{отн}} = \left(1 + \frac{[\eta]c}{8}\right)^8. \quad (6)$$

Соотношение между начальными скоростями уменьшения относительной и характеристической вязкости можно получить дифференцированием выражения (6) как сложной функции в начальный момент времени:

$$\left(\frac{d\eta_{\text{отн}}}{dt}\right)_0 = c \left(1 + \frac{[\eta]_0 c}{8}\right)^7 \left(\frac{d[\eta]}{dt}\right)_0 = c\eta_{\text{отн},0}^{7/8} \left(\frac{d[\eta]}{dt}\right)_0$$

(см. уравнение (6)), поэтому

$$\left(\frac{d[\eta]}{dt}\right)_0 = \frac{1}{c\eta_{\text{отн},0}^{7/8}} \left(\frac{d\eta_{\text{отн}}}{dt}\right)_0. \quad (7)$$

Окончательно, подставляя выражение (7) в формулу (5), получим уравнение, позволяющее определять начальную скорость ферментативного гидролиза полимера, измеряя начальную скорость уменьшения относительной вязкости раствора субстрата под действием эндофермента:

$$v_0 = - \frac{1}{xM_0[\eta]_0} \frac{1}{\eta_{\text{отн},0}^{7/8}} \left(\frac{d\eta_{\text{отн}}}{dt}\right)_0. \quad (8)$$

Выражение (8) можно использовать как для определения абсолютной активности эндоферментов (при условии, что имеется образец полимерного субстрата с известными характеристиками M_0 , x и $[\eta]_0$), так и для исследования влияния различных факторов на кинетику действия эндодеполимеразы. В последнем случае следует, однако, помнить, что величины x и $[\eta]_0$ для субстратов-полиэлектролитов могут изменяться с изменением рН, ионной силы, температуры. Поэтому для подобных исследований лучше использовать субстраты, не являющиеся полиэлектролитами (для эндоглюканазы, например, гликоальцеллюлозу [4]). При этом можно ограничиться исследованием влияния изучаемого фактора на величину $1/\eta_{\text{отн},0}^{7/8} (d\eta_{\text{отн}}/dt)_0$, непосредственно определяемую из кинетических данных.

В работах [5—10] также были получены уравнения, связывающие скорость ферментативной реакции и изменения вязкости раствора субстрата. Однако подход, предложенный в настоящей работе, представляется более простым, не требующим обработки длительных участков кинетических кривых уменьшения вязкости, так как он основан на определении только начальной скорости уменьшения вязкости в ходе ферментативной реакции.

Рассмотрим кривые уменьшения характеристической вязкости при небольших глубинах гидролиза, когда скорость ферментативной реакции (v) не слишком отличается от начальной скорости (v_0). Уравнение (5) (см. выше) можно преобразовать к виду

$$v_0 = - \frac{cA^{1/x}}{x[\eta]^{1+1/x}} \frac{d[\eta]}{dt}, \quad (9)$$

если молекулярный вес выразить через характеристическую вязкость с помощью уравнения (2).

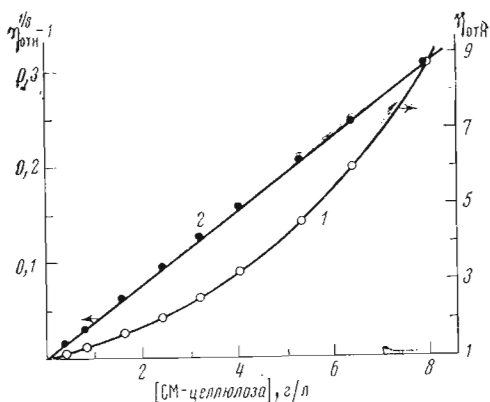


Рис. 1. Зависимость относительной вязкости растворов СМ-целлюлозы от ее концентрации в условиях изоионного разбавления (1) и линеаризации полученной зависимости с помощью уравнения Гесса — Филиппова (2)

рическим путем, а также в работах [11, 12] путем более сложных преобразований. Таким образом, оба метода теоретически согласуются друг с другом. Ниже приводится практическое сопоставление результатов обоих методов, являющееся доказательством применимости разработанного нами подхода.

Изучение кинетики ферментативного гидролиза карбоксиметилцеллюлозы по начальным скоростям уменьшения относительной вязкости. Как следует из рис. 1, 2, зависимость относительной вязкости раствора от концентраций полимера в исследуемом интервале концентраций хорошо описывается уравнением Гесса — Филиппова (6). Значение характеристической вязкости, рассчитанное из рис. 1, 2, составило 0,310 л/г.

Исследование зависимости величины $1/\eta_{\text{отн},0}^{7/8} (d\eta_{\text{отн}}/dt)_0$ пропорциональной начальной скорости ферментативной реакции, от концентрации СМ-целлюлозы показало, что при концентрациях в диапазоне 1,5—7,2 мг/мл скорость ферментативной реакции практически не зависит от концентрации субстрата и его исходной вязкости (рис. 2а). Из рис. 2б следует, что скорость реакции пропорциональна концентрации фермента в интервале 0,001—0,020 мг/мл. Таким образом, диапазон концентраций СМ-целлюлозы 1,5—7,2 мг/мл наиболее удобен для измерения эндоглюканазной активности, определяемой как $1/\eta_{\text{отн},0}^{7/8} (d\eta_{\text{отн}}/dt)_0$.

Данный метод определения активности эндоглюканаза из *Geotrichum candidum* имеет то преимущество, что не требует приготвления раствора субстрата с точно известной концентрацией и вязкостью, что на практике трудно осуществимо.

Наблюдаемые зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации фермента и субстрата (рис. 2) могут быть формально описаны в рамках схемы Михаэлиса при условии, что в указанном диапазоне концентрация субстрата намного превосходит константу Михаэлиса. Однако подобные закономерности могут в данном случае иметь и другое объяснение. Повышение концентрации субстрата одновременно существенно увеличивает вязкость реакционной среды и, следовательно, уменьшает коэффициенты диффузии фермента и субстрата. Таким образом, увеличение концентрации субстрата в реакционной системе может в принципе приводить к двум противоположным эффектам: увеличению скорости ферментативной реакции (в соответствии с известными кинетическими закономерностями) и уменьшению ее (если скорость диффузии субстрата к ферменту становится соизмеримой со скоростью химического

Уравнение (9) можно записать как

$$d([\eta]^{-1/x}) = \frac{v_0}{cA^{1/x}} dt, \quad (9')$$

так как

$$\frac{d([\eta]^{-1/x})}{dt} = -\frac{1}{x[\eta]^{1+1/x}} \frac{d[\eta]}{dt}.$$

Интегрирование (9') в пределах от $[\eta]_0$ до $[\eta]$ и от 0 до t дает уравнение, описывающее начальную часть кинетической кривой уменьшения характеристической вязкости в ходе гидролиза:

$$[\eta]^{-1/x} - [\eta]_0^{-1/x} = \frac{v_0}{cA^{1/x}} t. \quad (10)$$

Выражения, сходные с уравнениями (9) и (10), были получены авторами работ [5—9] полуэмпи-

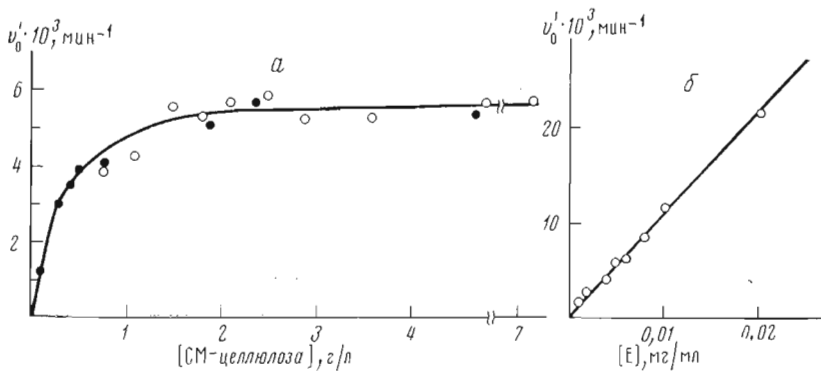


Рис. 2. Зависимость начальной скорости ферментативного гидролиза СМ-целлюлозы от весовой концентрации субстрата при концентрации целлюлазы 0,005 мг/мл; темные точки — экспериментальные данные, полученные в присутствии альгината натрия (а); от концентрации фермента при концентрации СМ-целлюлозы 4,2 мг/мл (б). Скорость реакции v_0' выражена в единицах уменьшения вязкости в минуту, $1/\eta_{\text{отн}, 0}^{7/8} (d\eta_{\text{отн}}/dt)_0$

превращения субстрата). Эти эффекты могут компенсироваться, приводя к кажущемуся кинетическому насыщению фермента субстратом (см. рис. 2а) даже в области концентраций СМ-целлюлозы, существенно меньших константы Михаэлиса. Данные, приведенные на рис. 2 б, не противоречат этим соображениям, так как увеличение концентрации фермента при постоянной концентрации субстрата не изменяет заметно вязкость реакционной системы и приводит к линейному возрастанию скорости ферментативной реакции (в условиях избытка субстрата, $[S]_0 \gg \gg [E]_0$). Для проверки данного предположения в настоящей работе было проведено изучение влияния вязкости на скорость ферментативного гидролиза СМ-целлюлозы.

Влияние вязкости среды на скорость ферментативной реакции. В качестве среды для проведения ферментативного гидролиза СМ-целлюлозы использовали буферный раствор с добавкой альгината натрия, который не гидролизуется целлюлазой (вязкость раствора относительно буфера без добавки 2,72). Вязкость раствора СМ-целлюлозы с концентрацией 4,7 мг/мл в буфере с добавкой альгината натрия относительно чистого буфера составила 10,2. Эта величина в 1,5 раза превышает относительную вязкость раствора СМ-целлюлозы максимальной концентрации, использованной в настоящей работе (7,2 мг/мл).

На рис. 2а сопоставлены данные кинетических экспериментов, проведенных при ферментативном гидролизе СМ-целлюлозы в присутствии альгината натрия, а также в его отсутствие. Сравнение этих данных приводит к выводу, что даже при 10-кратном увеличении вязкости реакционной системы скорость ферментативного гидролиза практически не изменяется. Таким образом, диффузионные эффекты не оказывают заметного влияния на скорость гидролиза СМ-целлюлозы под действием целлюлазы.

Использование более вязкой среды для проведения реакции позволило также получить с помощью вискозиметрического метода данные для ферментативного гидролиза СМ-целлюлозы при малых концентрациях (меньше 0,8 мг/мл), вязкость которых в чистом буферном растворе является недостаточной для проведения кинетических экспериментов. Как следует из рис. 2а, экспериментальные данные хорошо описываются теоретической кривой зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата с параметрами $K_m (\text{как}) = 0,3 \text{ г/л}$ и $V_{\text{как}} = 6 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$. Смысл найденных эмпирических параметров становится понятным, если приравнять выражение (8), выведенное для начальной скорости

ферментативного процесса, к уравнению Михаэлиса — Ментен:

$$v_0 = - \frac{1}{xM_0[\eta]_0} \frac{1}{\eta_{отн,0}^{7/8}} \left(\frac{d\eta_{отн}}{dt} \right)_0 = \frac{V[S]_0}{K_m + [S]_0}. \quad (11)$$

Так как $V_{каж}$ — максимальное значение величины $1/\eta_{отн,0}^{7/8} \cdot (d\eta_{отн}/dt)_0$ при высоких концентрациях субстрата ($[S]_0 \gg K_m$), то из выражения (11) следует, что

$$V_{каж} = xV[M]_0[\eta]_0 = 6 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}. \quad (12)$$

Выражение для кажущейся константы Михаэлиса можно найти, выразив концентрацию субстрата через молекулярный вес полимера. Концентрация альдегидных групп в конце действия эндоглюканазы равна c/M_∞ , где M_∞ — молекулярный вес негидролизующихся эндоглюканазой фрагментов полимера. Так как концентрация альдегидных групп в исходном растворе полимера равна c/M_0 , то конечная концентрация продукта действия эндоглюканазы, равная исходной концентрации субстрата, выразится как

$$[P]_\infty = [S]_0 = c \left(\frac{1}{M_\infty} - \frac{1}{M_0} \right), \quad (13)$$

а при $M_\infty \ll M_0$ $[S]_0 = c/M_\infty$.

Пользуясь этим выражением, нетрудно получить значение кажущейся константы Михаэлиса, найденное из зависимости величины $1/\eta_{отн,0}^{7/8} (d\eta_{отн}/dt)_0$ от концентрации субстрата:

$$K_m(\text{каж}) = K_m M_\infty = 0,3 \text{ г/л.}$$

Определение кинетических параметров ферментативного гидролиза СМ-целлюлозы путем обработки протяженных участков кинетических кривых уменьшения характеристической вязкости. В работе [14] было определено значение показателя степени x в уравнении Марка — Хоувинка (2) для СМ-целлюлозы в растворе, по составу сходном с использованным нами. Оно оказалось близким к единице. Поэтому уравнение (10), описывающее кривую уменьшения характеристической вязкости на небольших глубинах ферментативного гидролиза, примет следующий вид:

$$\frac{1}{[\eta]} - \frac{1}{[\eta]_0} = \frac{v_0}{Ac} t. \quad (14)$$

На рис. 3 представлена линейаризация трех кинетических кривых уменьшения вязкости растворов СМ-целлюлозы разной концентрации под действием целлюлазы в координатах $1/[\eta]$, t . Как следует из рисунка, удовлетворительная линейаризация достигается при уменьшении исходной характеристической вязкости (а следовательно, и молекулярного веса) не более чем на 30—40%. На большей глубине реакции наблюдается отклонение от линейной зависимости (14), связанное, вероятно, с тем, что по мере деградации субстрата сделанные при выводе уравнения (14) допущения становятся неоправданными. Вместо начальной скорости (v_0) в уравнение (14) можно подставить ее выражение в уравнении Михаэлиса — Ментен, принимая $[S]_0 = c/M_\infty$ (см. выше):

$$\frac{1}{[\eta]} - \frac{1}{[\eta]_0} = \frac{V}{A(K_m M_\infty + c)} t. \quad (15)$$

Согласно (15), величины, обратные тангенсам углов наклона прямых в координатах рис. 3, равные $A(K_m M_\infty + c)/V$, должны линейно зависеть от концентрации субстрата. Соответствующая линейаризация представлена на рис. 4, который позволяет определить величину $K_m M_\infty$ как отрезок, отсекаемый полученной прямой на оси абсцисс со знаком «минус». Эта величина оказалась равной 0,32 г/л, что практически совпадает со

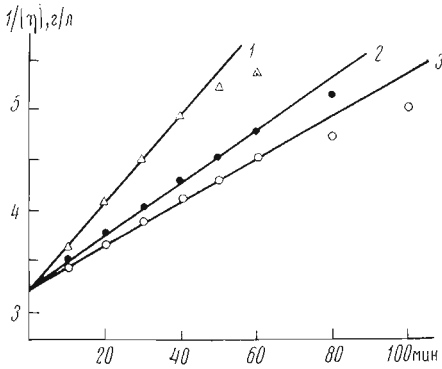


Рис. 3

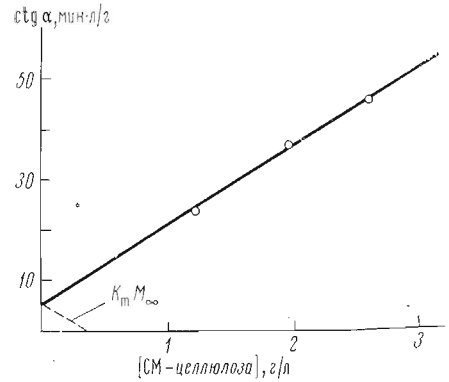


Рис. 4

Рис. 3. Обработка протяженных участков кинетических кривых уменьшения вязкости растворов карбоксиметилцеллюлозы под действием целлюлазы (0,005 мг/мл) в рамках уравнения (14). Концентрация субстрата (мг/мл): 1 — 1,22; 2 — 1,92; 3 — 2,58

Рис. 4. Зависимость котангенсов углов наклона прямых на рис. 3 от концентрации субстрата

значением 0,30 г/л, полученным при анализе зависимости начальной скорости уменьшения вязкости от весовой концентрации СМ-целлюлозы.

Тангенс угла наклона прямой на рис. 4 к оси абсцисс равен A/V . Рассчитанное отсюда значение V/A составило 0,064 г²/д²·мин. Выше мы отмечали, что найденное при анализе начальных скоростей уменьшения вязкости значение $\alpha M_0 [\eta]_0 V$ равно 0,006 мин⁻¹. Так как $\alpha = 1$ и уравнение Марка — Хоувинка (2) имеет вид $\alpha M_0 = [\eta]_0$, отношение $\alpha M_0 [\eta]_0 V : V/A$ должно равняться $[\eta]_0^2$.

Определенная таким способом из кинетических данных характеристическая вязкость исходного полимера, равная 0,308 л/г, находится в хорошем соответствии с величиной 0,31 л/г, найденной для раствора СМ-целлюлозы обычным способом (рис. 1, 2).

Таким образом, параметры ферментативного гидролиза карбоксиметилцеллюлозы, рассчитанные с использованием двух различных подходов, находятся в хорошем согласии, что обосновывает применимость развитого выше метода анализа начальных скоростей уменьшения относительной вязкости для исследования подобных ферментативных процессов.

Нахождение абсолютных значений кинетических параметров ферментативного гидролиза. Выше было показано, что определяемая в размерности г/л кажущаяся константа Михаэлиса связана с истинной константой выражением $K_{m(\text{каж})} = K_m M_\infty$. Для нахождения величины M_∞ следует привлечь данные о специфичности действия целлюлазы на замещенные субстраты. В работах [8, 13] было найдено, что эндоглюканазы обладают большим сродством к участкам полимера с несколькими незамещенными ангидроглюкозными звеньями (как правило, число незамещенных звеньев должно быть не менее трех).

Рассмотрим модель, в которой сродство фермента максимально к участкам полимерной цепи, состоящим не менее чем из n незамещенных ангидроглюкозных единиц. При степени замещения s и равновероятном распределении заместителей по глюкопиранозным звеньям целлюлозы доля незамещенных звеньев равна $(1-s)$, а доля всех последовательностей, начинающихся с n незамещенных звеньев, равна $(1-s)^n$ (см., например, [8]). Общая концентрация мономерных звеньев в растворе полимера с весовой концентрацией c есть c/M_1 (M_1 — средний молекулярный вес мономерного звена). Таким образом, концентрация участков полимера с n и более незамещенными звеньями равна $c(1-s)^n/M_1$. Принимая ее равной

концентрации субстрата s/M_∞ (см. выше), получим выражение для среднечислового молекулярного веса продукта гидролиза полимера под действием эндогликаназы:

$$M_\infty = \frac{M_1}{(1-s)^n}.$$

На практике, как показано в работе [13], истинная степень замещения s^* оказывается несколько меньше s , так как существует известная (хотя и небольшая) вероятность попадания двух и даже трех заместителей в одно глюкопиранозное кольцо. Средний молекулярный вес мономера (M_1) для СМ-целлюлозы со степенью замещения s должен быть рассчитан как $M_{C_6H_9O_5} + sM_{CH_2COONa}$.

Таким образом, расчетная формула для вычисления константы Михаэлиса в случае гидролиза СМ-целлюлозы есть

$$K_m = \frac{K_{m \text{ (как)}} (1-s^*)^n}{M_{C_6H_9O_5} + sM_{CH_2COONa}}.$$

Рассчитанная таким способом константа Михаэлиса для ферментативного гидролиза СМ-целлюлозы со степенью замещения 0,55 ($s^* = 0,5$, см. [13]) составляет: при наибольшем средстве эндогликаназы к участкам полимера с тремя и более незамещенными звеньями — $1,8 \cdot 10^{-4}$ М, с четырьмя и более — $0,9 \cdot 10^{-4}$ М, с пятью и более — $0,45 \cdot 10^{-4}$ М. Можно полагать, что для участков с шестью незамещенными звеньями константа Михаэлиса вряд ли сильно отличается от константы для незамещенных пентасахаридов. Поэтому в общем случае можно считать, что константа Михаэлиса для гидролиза СМ-целлюлозы под действием эндогликаназы из *Geotrichum candidum* находится в пределах $(0,45-1,8) \cdot 10^{-4}$ М.

Оценка абсолютной активности эндогликаназы приводит к следующим результатам. Как отмечалось выше,

$$V_{\text{как}} = xM_0 [\eta]_0 V = 0,006 \text{ мин}^{-1}$$

для концентрации фермента, равной 0,005 мг/мл.

Считая $x = 1$ и среднечисловой вес M_0 равным половине средневискозиметрического (такое молекулярно-весовое распределение встречается довольно часто), получим значение абсолютной активности данного препарата эндогликаназы, равное $1,2 \cdot 10^{-4}$ моль/мин на 1 г препарата, или 2 мк катал/г при 25°.

Экспериментальная часть

В работе использован препарат целлюлазы (КФ 3. 2. 1. 4) из *Geotrichum candidum*, выделение и очистка которого описаны в работе [15]. В качестве субстрата использовали натриевую соль СМ-целлюлозы со средневязкостной степенью полимеризации 350 и степенью замещения 0,55. Рассчитанный по этим данным средневязкостный молекулярный вес СМ-целлюлозы составил 70 000. Альгинат натрия с молекулярным весом 150 000 — продукт производства фирмы Whatman.

Растворы целлюлазы готовили растворением навески препарата фермента в соответствующем объеме 0,05 М ацетатного буфера, рН 4,5, в 0,1 М NaCl при умеренном перемешивании на магнитной мешалке в течение 20 мин. Нерастворимый осадок отделяли центрифугированием. Растворы использовали непосредственно после приготовления во избежание денатурации фермента при хранении.

Растворы субстрата готовили растворением навески СМ-целлюлозы в соответствующем объеме 0,05 М ацетатного буфера, рН 4,5, в 0,1 М NaCl (для обеспечения изоионного разбавления раствора в условиях варьирования концентрации субстрата). Раствор интенсивно перемешивали при нагревании (50—60°) на магнитной мешалке в течение 1 ч, затем

нерастворившийся остаток и образовавшиеся частицы геля удаляли центрифугированием в течение 45 мин при 8000 об/мин. Приготовленный прозрачный раствор СМ-целлюлозы использовали для вискозиметрических измерений в день его приготовления, так как при хранении раствора субстрата происходила деструкция растворенного полимера, приводящая к уменьшению характеристической вязкости раствора. Истинную весовую концентрацию СМ-целлюлозы в растворе определяли с помощью лиофильного высушивания точно измеренного объема раствора полимера после центрифугирования и сравнения веса сухого остатка с весом остатка, образующегося при высушивании такого же объема исходного буфера.

Кинетические эксперименты проводили с помощью вискозиметра Оствальда при 25° (время истечения 0,05 М ацетатного буфера, рН 4,5, в 0,1 М NaCl составляло $51,7 \pm 0,1$ с). Типичный кинетический эксперимент осуществляли так: в вискозиметр вносили 4,5 мл раствора субстрата и через 3—5 мин, когда раствор принимал требуемую температуру, добавляли 0,5 мл раствора фермента. Реакционную смесь быстро (в течение 8—10 с) перемешивали пропусканием воздуха и с помощью секундомера фиксировали время начала реакции. Примерно через 1 мин после начала реакции проводили первое измерение времени истечения реакционной смеси, второе и последующие измерения — через 2—3 мин после окончания предыдущего измерения. Перед каждым измерением раствор тщательно перемешивали пропусканием воздуха через капилляр вискозиметра. Результаты эксперимента наносили на график в координатах $\eta_{отн}$; $t_p + t_b/2$, где t_p — время, прошедшее от начала реакции до начала измерения, t_b — время истечения реакционной смеси, начало измерения которого совпадает с t_p (рис. 5). Относительную вязкость в процессе реакции рассчитывали как отношение времени истечения реакционной смеси ко времени истечения чистого буферного раствора, равному 51,7 с. за исключением экспериментов, проведенных в присутствии альгината натрия (0,3%). В последнем случае за относительную вязкость принимали отношение времени истечения реакционной смеси ко времени истечения буферного раствора с добавкой альгината, равному 141 с. Как следует из рис. 5, при небольших скоростях уменьшения вязкости экспериментальные точки в течение первых 10—15 мин реакции хорошо укладываются на прямую. Значение относительной вязкости в начальный момент реакции ($\eta_{отн,0}$) определяли экстраполяцией полученной прямой к оси ординат, а значение $(d\eta_{отн}/dt)_0$ — как тангенс угла наклона (α) прямой к оси абсцисс.

При анализе протяженных участков кинетических кривых уменьшения вязкости в процессе ферментативного гидролиза значения характеристической вязкости в момент времени t рассчитывали из соответствующих

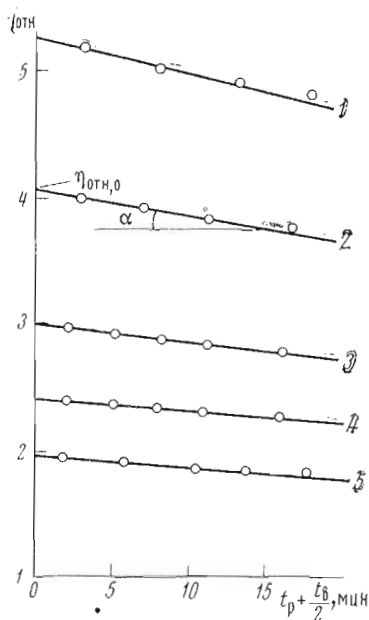


Рис. 5. Определение относительной вязкости и начальной скорости ее уменьшения в реакции гидролиза СМ-целлюлозы под действием целлюлазы путем обработки начальных участков кинетических кривых для различных начальных концентраций субстрата (мг/мл): 1 — 5,75; 2 — 4,80; 3 — 3,60; 4 — 2,87; 5 — 2,16. Концентрация целлюлазы во всех случаях равна 0,005 мг/мл. Условные обозначения и расчет см. «Экспер. часть»

значений относительной вязкости с помощью выражения

$$[\eta]_t = \frac{8}{c} (\eta_{\text{отн.}, t}^{45} - 1),$$

считая весовую концентрацию полимера постоянной в ходе реакции.

Авторы благодарят сотрудников Института биохимии им. А. И. Баха Академии наук СССР Н. А. Родионову и Н. А. Тиуну за предоставление ферментного препарата, за помощь и интерес к работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hultin E. (1949) Acta chem. scand., 3, 625—629.
2. Hultin E., Wanntorp I. (1966) Acta chem. scand., 20, 2667—2677.
3. Jools P., Sierens W., Russen R. (1969) J. Pharm. and Pharmac., 21, 848—853.
4. Iwasaki T., Tokuyasu K., Funatsy M. (1964) J. Biochem., 55, 30—36.
5. Almin K. E., Eriksson K.-E. (1967) Biochim. et biophys. acta, 139, 238—247.
6. Almin K. E., Eriksson K.-E., Jansson C. (1967) Biochim. et biophys. acta. 139, 248—253.
7. Almin K. E., Eriksson K.-E. (1968) Arch. Biochem. and Biophys., 124, 129—134.
8. Eriksson K.-E., Holmark B. H. (1969) Arch. Biochem. and Biophys., 133, 233—237.
9. Almin K. E., Eriksson K.-E., Petersson B. (1975) Eur. J. Biochem., 51, 207—211.
10. Hulme M. A. (1971) Arch. Biochem. and Biophys., 147, 49—54.
11. Chetkarov M., Koleff D. (1969) Monatsh. Chemie, 100, 976—985.
12. Chetkarov M., Koleff D. (1969) Monatsh. Chemie, 100, 986—997.
13. Klop W., Kooiman P. (1965) Biochim. et biophys. acta, 99, 102—120.
14. Sitaramaiah G., Goring D. A. (1962) J. Polymer Sci., 58, 1107—1131.
15. Родионова Н. А., Тиунова Н. А., Фениксова Р. В., Кудряшова Т. И., Мартиневич Л. И. (1974) Докл. АН СССР, 214, 1206—1209.

Поступила в редакцию
14.X.1976

KINETICS OF THE ACTION OF CELLULOLYTIC ENZYMES FROM *GEOTRIHUM CANDIDUM*. VISCOSIMETRIC ANALYSIS OF CARBOXYMETHYL CELLULOSE HYDROLYSIS

RABINOWITCH M. L., KLYOSOV A. A., BEREZIN I. V.

Laboratory of Chemical Enzymology, M.V. Lomonosov State
University, Moscow

The kinetics have been studied for hydrolysis of soluble carboxymethyl cellulose catalyzed by endoglucanase from cellulolytic system of *Geotrihum candidum*. The kinetics were measured by a viscosimetric method which involves measuring initial rates of decrease in viscosity of the polymer substrate. The method allows to evaluate the endoglucanase activity in absolute terms (μ mol, glycosidic bonds broken per minute). The absolute endoglucanase activity toward carboxymethyl cellulose at 25° C, pH 4.5 was equal to 120 u/g or 2 μ catal/g of cellulose preparation. It was shown that the carboxymethyl cellulose hydrolysis is described by the Michaelis kinetic scheme with $K_m = (0.45—1.8) \cdot 10^{-4}$ M. The possibility of utilization the above mentioned viscosimetric procedure in kinetic studies of endo-depolymerases is considered.