



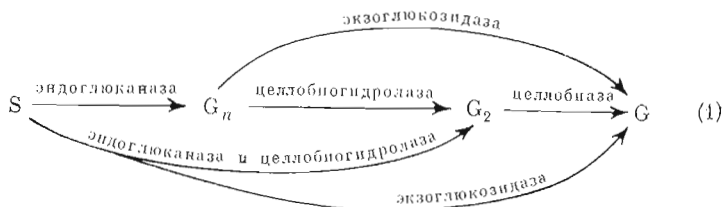
УДК 577.154.33.08

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

I. АКТИВНОСТЬ И КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ
ЦЕЛЛЮЛАЗНЫХ КОМПЛЕКСОВ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ*Клесов А. А., Рабинович М. Л., Синицын А. П.,
Чурилова И. В., Григораш С. Ю.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет, кафедра химической энзимологии*

Разработаны теоретические и практические подходы к определению активностей четырех основных компонентов целлюлазного комплекса — эндоглюканазы, экзоглюкозидазы, целлобиогидролазы и целлобиазы. Изучен качественный и количественный состав компонентов для 30 целлюлазных комплексов из различных источников. Выявлены корреляции между активностями отдельных компонентов и суммарными (эффективными) активностями целлюлазных комплексов.

Ферментная система, катализирующая гидролитическое расщепление целлюлозы и ее производных, получила название целлюлазного комплекса. По современным представлениям, целлюлазный комплекс состоит из карбогидраз четырех типов [1-4]: эндо-1,4- β -глюканаза (1,4- β -D-глюкан-4-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.4), экзо-1,4- β -глюканаза (экзо-целлобиогидролаза или 1,4- β -D-глюкан-целлобиогидролаза, КФ 3.2.1.91), экзо-1,4- β -глюкозидаза (1,4- β -D-глюкан-глюкогидролаза, КФ 3.2.1.74) и целлобиаз (β -глюкозидаза или β -D-глюкозидглюкогидролаза, КФ 3.2.1.21). Общую схему ферментативного гидролиза целлюлозы можно представить в следующем виде [2]:



где S — исходный субстрат, G_n — целлоолигосахариды (продукты статистического гидролиза целлюлозы), G_2 — целлобиоза и G — глюкоза. В зависимости от физического состояния исходного субстрата G_n может представлять собой либо частично деструктурированную нерастворимую целлюлозу с относительно низкой степенью полимеризации по сравнению с исходным нерастворимым субстратом, либо набор замещенных целлодекстринов (при гидролизе растворимых производных целлюлозы, например СМ-целлюлозы).

В литературе обсуждается ряд других схем ферментативного гидролиза целлюлозы (см. обзоры [5—12]), которые, на наш взгляд, либо являются частными случаями вышеприведенной схемы, либо основаны на недостаточно корректных (или априорных) посылах, например на существовании «предгидролитического фактора», или «эндогликаназы особого типа», специфической только по отношению к кристаллическим участкам нерастворимой целлюлозы [8—12]. Тот факт, что так называемая C_1 — C_x -концепция ферментативного гидролиза целлюлозы, предложенная в начале 50-х годов [13] и отражавшая уровень развития проблемы в то время, все еще весьма широко распространена в литературе, свидетельствует о недостаточном понимании механизма этой реакции и роли отдельных компонентов целлюлазного комплекса. Согласно этой концепции, C_1 -ферменты играют основную роль в гидролизе нерастворимой или кристаллической целлюлозы, а C_x -ферменты — в гидролизе растворимой или аморфной целлюлозы. Напротив, по современным представлениям, гидролиз целлюлозы в обоих физических состояниях осуществляется одними и теми же целлюлолитическими ферментами [2, 9, 14].

На наш взгляд, отсутствие в литературе общепринятого механизма ферментативного гидролиза целлюлозы можно объяснить двумя основными причинами. Во-первых, использование исследователями целлюлазных комплексов различного качественного состава и количественного содержания отдельных компонентов приводит к тому, что стадии, определяющие скорость ферментативного гидролиза целлюлозы, в различных случаях варьируются. Это приводит к кажущейся неоднозначности выводов, полученных разными авторами, усугубляющейся использованием в качестве субстратов различных целлюлозосодержащих веществ и отсутствием до последнего времени адекватных методов определения активностей отдельных компонентов целлюлазного комплекса. Во-вторых, в литературе известно лишь небольшое число работ по анализу кинетики ферментативного гидролиза целлюлозы [15—19], и почти во всех случаях целлюлазный комплекс для простоты рассматривают как один фермент. На самом деле это упрощение во многих случаях недопустимо, поскольку, как упоминалось выше, стадия, лимитирующая скорость гидролиза, может различаться для целлюлазных комплексов различного состава. Более того, она может меняться даже в ходе ферментативной реакции, при переходе от начального периода реакции к определенным глубинам гидролиза целлюлозы.

Настоящей статьей мы открываем цикл работ по ферментативному гидролизу целлюлозы, основная цель которого — обоснование схемы реакции, приведенной выше (или ее соответствующая конкретизация) для гидролиза растворимых и нерастворимых производных целлюлозы, а также природных целлюлозосодержащих веществ, и выявление роли отдельных компонентов целлюлазного комплекса при ферментативном гидролизе различных субстратов. Помимо этого в круг вопросов, рассматриваемых в данном цикле работ, входит также разработка новых методов изучения состава и свойств компонентов целлюлазного комплекса различного происхождения, роль адсорбции целлюлолитических ферментов на поверхности нерастворимых субстратов и кинетика действия адсорбированных ферментов, влияние стабильности отдельных компонентов целлюлазного комплекса на кинетику ферментативного гидролиза целлюлозы, изучение функции и регуляции полиферментной системы целлюлазного комплекса в ходе реакции, а также влияния физических характеристик нерастворимой целлюлозы на кинетику ее гидролиза. Для количественного описания ферментативного гидролиза целлюлозы в настоящем цикле исследований разрабатывается кинетика действия полиферментной системы целлюлазного комплекса в стационарном и нестационарном режимах протекания реакции.

Основная задача первой части исследования заключалась в разработке теоретических и практических подходов к определению активности отдель-

ных компонентов целлюлазного комплекса и в сравнительном изучении состава целлюлазных комплексов различного происхождения. Главный принцип характеристики целлюлолитических ферментов состоял в том, чтобы активности отдельных компонентов выражались в единицах, которые можно сравнивать при изучении препаратов в различных лабораториях. Такие единицы рекомендованы Международным биохимическим союзом и характеризуют активность фермента, приводящую к превращению 1 мкмоль субстрата за 1 мин при данных условиях эксперимента [3].

Перейдем к рассмотрению и обоснованию методов определения активности отдельных компонентов целлюлазного комплекса, используемых в настоящей работе, поскольку этот вопрос зачастую является критическим при рассмотрении экспериментальных данных.

Активность эндо-1,4-β-глюканаз. В большинстве случаев активность эндоглюканаз целлюлазного комплекса выражают в относительных единицах, удобных лишь для сравнительного определения соответствующих активностей комплекса в пределах одной лаборатории. Методы вискозиметрического определения эндоглюканазной активности в абсолютных единицах (рекомендованных Международным биохимическим союзом, см. выше) были разработаны Эриксоном с сотр. [20–22], Четкарвым и Колевым [23] и Халме [24]. Это позволило внести определенную стандартизацию при измерении соответствующих активностей. Тем не менее общий недостаток данных методов — необходимость достаточно сложной математической обработки протяженных участков кривой уменьшения вязкости реакционной смеси во времени. В настоящей работе для определения активности эндоглюканаз целлюлазного комплекса использован вискозиметрический метод, разработанный нами ранее [25]. В отличие от других подобных методов он позволяет определять начальную скорость ферментативного гидролиза растворимого полимерного субстрата (СМ-целлюлозы). Такой подход представляется более оправданным по нескольким причинам. Во-первых, допущения, которые обычно вводятся при переходе от вискозиметрических характеристик растворов к молярным концентрациям реагентов, наиболее строго выполняются именно в начальный период реакции. Во-вторых, начальный период уменьшения вязкости субстрата под действием эндоглюканаз наименее подвержен влиянию экзоглюканаз, как правило, также присутствующих в целлюлазном комплексе. Наконец, уменьшение вязкости субстрата в начальный период реакции обусловлено гидролизом участков полимера, наиболее чувствительных к действию эндоглюканаз, что представляет наибольший интерес при изучении их активности.

В основе используемого нами вискозиметрического метода определения эндоглюканазной активности целлюлазного комплекса [25] лежит определение начальной скорости уменьшения относительной вязкости раствора карбоксиметилцеллюлозы при добавлении ферментного препарата. Переход от относительной вязкости к характеристической при расчете абсолютной активности эндоглюканаз осуществляется с помощью уравнения Гесса — Филиппова, и в свою очередь переход от характеристической вязкости к молярным концентрациям расщепляемых гликозидных связей в единицу времени проводится с использованием уравнения Марка — Хоувинка [25]. Простая формула для расчета активности эндоглюканаз и условия определения приведены в «Экспериментальной части».

Для иллюстрации адекватности данного подхода к определению эндоглюканазной активности в табл. 1 проведено сравнение результатов метода, основанного, с одной стороны, на вискозиметрии, а с другой — на определении восстанавливающих сахаров, образующихся при гидролизе карбоксиметилцеллюлозы под действием целлюлазного комплекса. Ранее было специально показано, что регистрируемые при этом восстанавливающие группы в условиях определения принадлежат в основном высшим олигосахаридам, образующимся под действием эндоглюканаз [26]. Как видно

Начальные скорости гидролитического расщепления растворимой СМ-целлюлозы под действием целлюлазных препаратов из различных источников. Сопоставление различных методов регистрации скорости ферментативного гидролиза

Препарат (источник)	v ₀ , мкМ/мин·г	
	Вискозиметрический метод	Метод Шомоди — Нельсона (за вычетом глюкозы)
Пектофетидин ГЗХ	22	27
Целлобронин ГЗХ	26	17
Целлолигнорин П10Х	36	43
Целлокандин ГЗХ	41	45
Целловиридин ГЗХ	70	95
Целлоковингин П10Х	120	85
Целлокандин Г10Х	130	100
<i>Thermoactinomyces</i> sp.	43	47
<i>Aspergillus niger</i> (Sigma)	110	120
<i>Asp. niger</i> (Serva)	120	110
<i>Asp. niger</i> (Koch-Light)	290	300
Rapidase	700	760
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	1000	720
<i>T. reesei</i>	2000	1800

из табл. 1, при использовании целлюлазных комплексов различного происхождения оба метода (второй более трудоемок) дают близкие результаты.

Величины эндоглюканазной активности для 30 целлюлазных комплексов из различных источников приведены в табл. 2 и обсуждаются ниже.

Активность экзо-1,4-β-глюкозидаз. Единственный подход к количественному определению активности экзоглюкозидаз целлюлазного комплекса был опубликован 10 лет назад Ризом [27] и с тех пор в литературе практически не применялся. Основные причины этого — необходимость использования дефицитного субстрата, целлотетраозы, и наличие достаточно серьезных допущений, положенных в основу метода Риза. Так, в этом методе априори принимается, что независимо от происхождения целлюлазного комплекса отношение скоростей образования глюкозы при гидролизе целлотетраозы и целлобиозы под действием экзоглюкозидазы составляет 100, а под действием целлобиазы — 0,2. Здесь не учитываются, во-первых, возможные различия в субстратной специфичности ферментов из различных источников и, во-вторых, возможный (и вполне вероятный) вклад эндоглюканазы в скорость гидролиза целлотетраозы. Тем не менее работа Риза [27] имела важное значение, так как показала наличие экзоглюкозидазы в большом количестве целлюлазных комплексов различного происхождения.

Нами разработан количественный метод определения активности экзоглюкозидазы в целлюлазных комплексах, в значительной мере свободный от указанных недостатков. В частности, в качестве субстрата использовали обычный растворимый субстрат целлюлаз — карбоксиметилцеллюлозу. Метод не требует допущений о сходстве экзоглюкозидаз из различных источников. Графическое определение активности экзоглюкозидазы приведено на рис. 1 и 2 (как видно, во втором случае из того же эксперимента можно определить и активность целлобнигидролазы, см. ниже).

Метод основан на том положении, что образование глюкозы из карбоксиметилцеллюлозы может происходить под действием двух ферментов целлюлазного комплекса — экзоглюкозидазы и целлобиазы (схема 1). Изучение скорости образования D-глюкозы в присутствии различных концентраций добавленной целлобиазы и экстраполяция полученных данных на целлюлазный комплекс, не содержащий целлобиазу (точка пересечения сплошной прямой на рис. 1 и 2 с осью ординат), позволяют определить

Активности целлюлазных комплексов различного происхождения

Таблица 2

Препарат	Источник	Суммарные активности целлюлазных препаратов, ед. акт./г			Эндоглюканаза	Экзоглюкозидаза	Активности отдельных компонентов целлюлазного комплекса, ед. акт./г
		фильтровальной бумаги (метод Ман-дельса — Вебера)	СМ-целлюлозы (образованные D-глюкозы)	п-нитрофенилгликозида			
I. Исочиненные технические препараты							
Целлолитворин ПХ	<i>T. lignorum</i>	9,2	1,2	3,7	18	0,8	6
Целлобронн ГЗХ	<i>T. longibrachiatum</i>	11	18	0,2	26	10	5
Целлоксандин ГЗХ	<i>Geotrichum candidum</i>	11	8	7,5	41	7	3,5
Целловиридин ГЗХ	<i>T. viride</i>	6,5	15	1,6	70	12	0,5
Целлолитворин П10Х	<i>T. lignorum</i>	16	7	4,5	36	4	12
Целлоксандин П10Х	<i>T. koningi</i>	24	40	12	120	35	13
Целлоксандин Г10Х	<i>G. candidum</i>	—	—	30	130	—	45
Пектофостидин ГЗХ	<i>Asp. foetidus</i>	5,2	3	3,7	22	—	28
Пектофостидин П10Х	<i>Asp. foetidus</i>	7,9	30	3,4	50	—	120
II. Коммерческие препараты							
Nagasa (Япония)		14	30	<0,5	60	20	17
Arpidase (Франция)		74	7	1,5	700	5	<1
Serva (ФРГ)	<i>Asp. niger</i>	37	80	50	120	20	425
Sigma (США)	<i>Asp. niger</i>	42	75	53	110	<7	735
Koch-Light (Англия)	<i>Asp. niger</i>	35	35	25	290	5	50
Sigma (США)	<i>T. viride</i>	10	6	37	20	3	11
Novo (Дания)	<i>T. reesei</i>	200	350	28	3000	350	20
III. Технические препараты, очищенные гель-филтрацией							
	<i>T. lignorum</i>	83	130	150	730	110	25
	<i>T. lignorum</i>	120	200	160	830	130	100
	<i>T. lignorum</i>	270	320	250	830	200	270
	<i>T. longibrachiatum</i>	170	250	37	1000	175	70
	<i>T. viride</i>	93	150	45	500	120	33
	<i>G. candidum</i>	—	300	—	5700	250	90
	<i>G. candidum</i>	430	650	420	4000	600	800
	<i>T. koningi</i>	120	220	150	1300	180	57
	<i>Asp. foetidus</i>	37	210	43	170	<10	3400
IV. Лабораторные препараты							
	<i>Thermoastynomycus</i> sp.	7,4	0,3	3	43	<0,3	<0,5
	Ассоциат бактерий	10	0,5	0,8	70	<0,3	<0,5
	<i>M. verrucaria</i>	10	6	0,9	66	5	1
	<i>Asp. terreus</i>	74	110	9,5	340	70	35
	<i>T. reesei</i>	290	650	40	2000	650	35

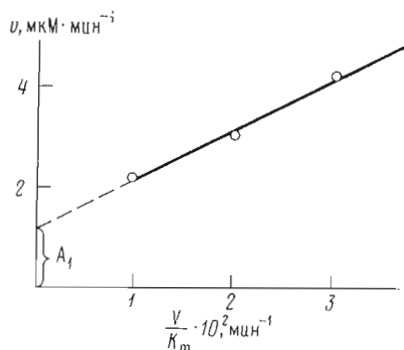


Рис. 1. Влияние добавленной целлюлазы на стационарную скорость образования *D*-глюкозы из СМ-целлюлозы под действием целлюлазного комплекса из *G. candidum*. В качестве целлюлазы использован очищенный целлюлазный препарат из *Asp. foetidus*. Ось абсцисс – сумма констант скоростей первого порядка действия на целлюлозу собственной целлюлазы целлюлазного комплекса и добавленной целлюлазы. Индекс A_1 соответствует активности экзоглюкозидазы в комплексе. Концентрация карбоксиметилцеллюлозы 0,1%, концентрация целлюлазного комплекса 0,01 г/л, pH 4,5; 40° С

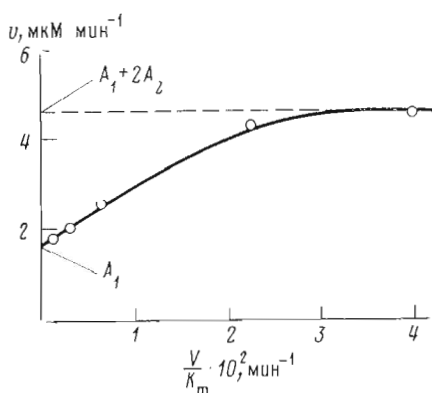


Рис. 2

Рис. 2. Определение активности экзоглюкозидазы и целлюбогидролазы целлюлазного комплекса из *T. reesei*. Обозначения координатных осей и условия опыта аналогично рис. 1. Индексы A_1 и A_2 соответствуют активности экзоглюкозидазы и целлюбогидролазы соответственно

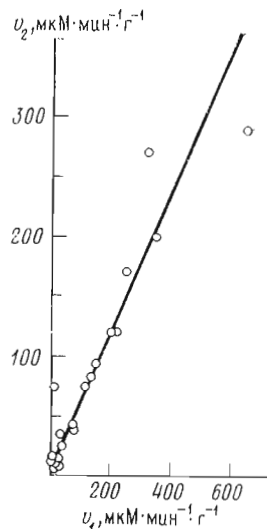


Рис. 3

Рис. 3. Корреляция между скоростью образования *D*-глюкозы из растворимой карбоксиметилцеллюлозы (v_1) и скоростью образования общих восстанавливающих сахаров из фильтровальной бумаги по методу Мандельс – Вебера (v_2) для целлюлазных препаратов, приведенных в табл. 2

вклад целлюлазы в образование глюкозы и рассчитать активность экзоглюкозидазы в целлюлазном комплексе.

Так как величины констант Михаэлиса для собственной целлюлазы изучаемого целлюлазного комплекса и добавляемой целлюлазы могут различаться, для большей корректности эксперимента мы независимо определяли значения V/K_m обеих целлюлаз (см. «Экспериментальную часть») и сумму этих величин откладывали на оси абсцисс рис. 1 и 2.

Как было показано нами ранее, вклад эндоглюканазы в образование глюкозы из карбоксиметилцеллюлозы пренебрежимо мал [26].

Обоснование данного метода можно провести следующим образом. Из схемы 1 следует, что скорость образования глюкозы (v) под действием ферментов целлюлазного комплекса определяется выражением

$$v = v_1 + \frac{V}{K_m} [G_2], \quad (2)$$

где v_1 — скорость образования глюкозы из высших олигосахаридов (G_n на схеме 1) под действием экзоглюкозидазы, V и K_m — эффективные кинетические параметры (максимальная скорость реакции и константа Михаэлиса) образования глюкозы из целлобиозы под действием целлобиазы. Данное выражение справедливо в условиях, когда скорость образования глюкозы из целлобиозы пропорциональна концентрации промежуточного субстрата (другими словами, когда концентрация целлобиозы значительно меньше эффективной константы Михаэлиса для соответствующей ферментативной реакции) [28].

При добавлении целлобиазы в реакционную систему возможны два крайних случая: а) стационарная скорость ферментативного образования глюкозы из СМ-целлюлозы линейно растет с увеличением концентрации добавленной целлобиазы, б) стационарная скорость не зависит от концентрации добавленной целлобиазы. В первом случае стадией, лимитирующей скорость образования глюкозы из СМ-целлюлозы, является расщепление промежуточной целлобиозы (G_2 на схеме 1) под действием целлобиазы. Экстраполяция зависимости 2 к нулевому содержанию целлобиазы в комплексе приводит к соотношению $v = v_1$. Соответствующая зависимость отсекает на оси ординат (рис. 1 и 2) величину скорости образования глюкозы под действием экзоглюкозидазы или величину активности экзоглюкозидазы целлюлазного комплекса. Условия определения активностей приведены в «Экспериментальной части», а полученные результаты анализа целлюлазных комплексов из различных источников даны в табл. 2.

Активность экзо-1,4-β-глюконаз (экзо-целлобиогидролаз). До настоящего времени не существовало методов определения активности целлобиогидролаз в целлюлазных комплексах. Определение реакционной способности целлобиогидролаз было проведено несколькими авторами только после выделения и очистки этих ферментов и доказательства их гомогенности [14, 29–33]. Нами разработан графический способ определения активности целлобиогидролаз в смеси с другими компонентами целлюлазного комплекса. Практическое определение активности целлобиогидролазы показано на рис. 2 (активность данного фермента, как видно из рисунка, можно определить одновременно с активностью второго экзофермента целлюлазного комплекса — экзоглюкозидазы). Для этого увеличивают концентрацию добавленной целлобиазы и регистрируют соответствующую скорость образования D -глюкозы под действием смешанного целлюлазного комплекса. Стационарная скорость образования глюкозы из карбоксиметилцеллюлозы при этом стремится к пределу

$$v = v_1 + 2v_2,$$

который определяется стационарной скоростью предыдущей стадии (v_2) образования целлобиозы из олигосахаридов под действием целлобиогидролазы (схема 1). Коэффициент 2 отражает здесь образование двух молекул глюкозы при гидролитическом расщеплении целлобиозы. Таким образом, изучение скорости образования глюкозы в присутствии добавленной целлобиазы позволяет определить стационарную скорость образования целлобиозы под действием целлюлазного комплекса

$$v_2 = \frac{v - v_1}{2} \quad (3)$$

и, следовательно, рассчитать активность целлобиогидролазы в смеси с другими целлюлолитическими ферментами. На рис. 2 эту величину определя-

ют как половину разности между точками пересечения пунктирной и сплошной прямых с осью ординат.

Активность целлюлазы обычно измеряют по скорости накопления восстанавливающих групп в растворе при ферментативном гидролизе целлюлозы. Нами было показано, что значительно более точным в этом случае является определение концентрации образующейся *D*-глюкозы с помощью сопряженной ферментативной реакции [34]. Условия измерения целлюлазной активности и расчетные формулы приведены в «Экспериментальной части», а соответствующие результаты изучения целлюлазных комплексов из различных источников — в табл. 2. В соответствии с рекомендациями Международного биохимического союза активности целлюлазы выражены в скоростях расщепления субстрата целлюлозы, а не образования продукта — глюкозы.

Характер активности целлюлазного комплекса по гидролизу фильтровальной бумаги. Наиболее широко известный способ определения активности целлюлазного комплекса — метод Мандельс — Вебера [35, 36], основанный на количественной регистрации восстанавливающих сахаров, образующихся при гидролизе фильтровальной бумаги. Популярность данного метода в значительной степени объясняется простотой его проведения, а также тем, что с его помощью определяется активность не какого-либо одного отдельного компонента, а суммарная активность целлюлазного комплекса по отношению к нерастворимому субстрату. Естественно, метод Мандельс — Вебера не может заменить селективные способы определения активностей отдельных компонентов целлюлазного комплекса, но он полезен для быстрой полуколичественной характеристики эффективности всего комплекса.

До настоящего времени в литературе не решено, активность каких компонентов целлюлазного комплекса в основном определяют с помощью метода Мандельс — Вебера. Ответ на этот вопрос в свою очередь зависит от того, активность какого компонента лимитирует скорость образования общих восстанавливающих сахаров (глюкозы, целлюлозы и высших растворимых целлоолигосахаридов) при гидролизе фильтровальной бумаги под действием целлюлазных комплексов. Детальный анализ этой проблемы будет проведен в последующих статьях данного цикла работ, однако уже на основании результатов настоящей статьи можно заключить, что для действия различных целлюлазных комплексов стадия, лимитирующая скорость реакции, может быть различной.

По-видимому, из относительно очищенных препаратов только для комплексов из *T. lignorum* и *Asp. foetidus* и для коммерческих препаратов целлюлаз из *Asp. niger* (Sigma и Serva, табл. 2) скорость гидролиза фильтровальной бумаги лимитируется действием эндоглюканазы, поскольку эти препараты содержат относительно высокие количества целлюлазы. Напротив, для препаратов из *T. reesei* и Rapidase скорость гидролиза бумаги в значительной степени лимитируется действием целлюлазы. Для большинства остальных препаратов, приведенных в табл. 2, метод Мандельс — Вебера в большей или меньшей степени характеризует активность всех компонентов целлюлазного комплекса (коэффициент корреляции с активностью эндоглюканазы равен 0,9, с активностью экзоглюкозидазы — 0,92 и с активностью целлюлазы — 0,07).

Наилучшая корреляция наблюдается между активностью целлюлазного комплекса по методу Мандельс — Вебера, с одной стороны, и скоростью образования глюкозы из СМ-целлюлозы под действием всего целлюлазного комплекса — с другой (рис. 3). Отсюда следует достаточно важный вывод, что определение суммарной активности целлюлазного комплекса можно в равной мере проводить с использованием как нерастворимого субстрата, определяя общие восстанавливающие сахара, так и растворимой СМ-целлюлозы, определяя *D*-глюкозу в качестве продукта реакции. Во

многих случаях последний метод проще осуществить на практике, и он легче поддается стандартизации.

Суммарная активность целлюлазных комплексов, определяемая с помощью обоих методов, в целом зависит от многих факторов и может в равной степени изменяться при варьировании как абсолютных активностей отдельных компонентов комплекса, так и соотношения между ними. Помимо этого абсолютные величины суммарной активности целлюлазных комплексов из различных источников зависят от специфичности отдельных компонентов комплекса, от характера и степени ингибирования продуктами ферментативного гидролиза, от времени выхода реакции на стационарный режим (которое может быть меньше или больше 1 ч, рекомендованного для определения активности по методу Мандельс — Вебера [35, 36] и, в свою очередь, определяться качественным и количественным составом целлюлазного комплекса) и от других достаточно произвольных или неконтролируемых факторов.

По-видимому, определение суммарной активности целлюлазных комплексов (по методу Мандельс — Вебера или по образованию глюкозы из СМ-целлюлозы) целесообразно лишь при серийных анализах в ходе выделения или очистки целлюлолитических препаратов или при текущем контроле за процессами их биосинтеза. При более детальном изучении целлюлазных комплексов, в частности при определении их возможности гидролизовать природную целлюлозу, оба суммарных метода не являются адекватными, и в данном случае следует определять активность отдельных компонентов целлюлазного комплекса (см. табл. 2). Так, препарат *Rapidase*, характеризующийся достаточно высокой активностью по методу Мандельс — Вебера (табл. 2), практически не гидролизует микрокристаллическую целлюлозу или хлопок [28, 37]. С другой стороны, очищенные препараты из *T. lignorum*, обладающие близкими к *Rapidase* активностями по методу Мандельс — Вебера, но содержащие значительно больше целлобиазы и экзоглюкозидазы (табл. 2), характеризуются достаточно высокой скоростью гидролиза природной целлюлозы [28].

Как видно из табл. 2, состав целлюлазных комплексов различного происхождения варьирует в широких пределах. Столь разнообразный качественный и количественный состав полиферментных целлюлазных препаратов предоставляет большие возможности для изучения механизмов целлюлолитических реакций и выявления роли отдельных ферментных компонентов в гидролизе целлюлозы и ее производных. Эти вопросы, а также результаты изучения ферментативного гидролиза целлюлозы под действием целлюлазных препаратов, состав и активность которых были определены в настоящей работе, будут изложены в последующих статьях данного цикла исследований.

Экспериментальная часть

В работе использованы 30 целлюлазных препаратов из различных источников, а также различной степени очистки. Микробные источники препаратов приведены в табл. 1. Препараты целлюлитория ЦХ, целлюлянорин П10Х, целлюколинтин П10Х, целлобронин ГЗХ, целловиридин ГЗХ, целлокандин ГЗХ, пектофоетидин ГЗХ, пектофоетидин П10Х — отечественного производства. Препарат целлокандин Г10Х, а также препарат из *M. verrucaria* получены в лаборатории ферментных препаратов Института биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, очищенные препараты целлюлитория П10Х, целловиридина ГЗХ, целлокандина ГЗХ, целлюколингина П10Х и пектофоетидина П10Х — в лаборатории по получению ферментов для медицинских целей ВНИИбиотехника. Очищенные препараты из *T. lignorum* (глубинная культура ОМ 534-6) получены в Институте микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР и на Олайнском заводе химических реактивов. Препарат из *Asp. terreus* получен в Институте микробиологии АН

СССР, препарат бактериальной целлюлазы (ассоциата *Bacterium alcaligenes*, *Pseudomonas desmoluticum*, *Bacillus megaterium*, *Bacterium album*, *Chromobacterium rheni* и *Cytophaga hutchisoni* [38]) — во ВНИИ прикладной энзимологии (Вильнюс). Препарат из *Thermoastynomyses* sp. получен из Пенсильванского университета (Филадельфия, США); очищенный препарат из *T. reesei* — из Армейского центра США по исследованиям и разработкам (Нейтик, штат Массачусетс). Препараты производства коммерческих фирм Японии, Франции, ФРГ, Англии, Дании и США приведены в табл. 1.

В качестве субстратов использовали натриевую соль СМ-целлюлозы (степень замещения 0,7, средневязкостная степень полимеризации 450) отечественного производства, *D*-целлобиозу (Chemapol, Чехословакия), *n*-нитрофениловый эфир β -*D*-глюкопиранозида (синтезирован по методу [39], степень чистоты 90%), хроматографическую бумагу Whatman No 1 (Великобритания).

Для регистрации продуктов ферментативного гидролиза целлюлозы и ее производных использовали глюкозооксидазу отечественного производства (активность 97 000—134 000 ед. акт./г по выходным данным) и пероксидазу из хрена (активность 350 000—400 000 ед. акт./г по выходным данным) производства фирмы Reanal (Венгрия), *D*-глюкозу (Союзреактив, х.ч.), *o*-дианизидин отечественного производства (ч., очищен возгонкой в вакууме), соли (х.ч.). Динитросалициловый реагент Самнера [40] для регистрации восстанавливающих сахаров по методу Мандельс — Вебера [35, 36] готовили из 0,63% динитросалициловой кислоты (Chemapol, Чехословакия), 18,2% тартрата калия-натрия, 0,5% фенола, 0,5% бисульфита натрия, 2,14% едкого натра.

Растворы целлюлазных препаратов готовили следующим образом: добавляли определенную навеску препарата к 0,05 М натрий-ацетатному буферу (содержащему 0,1 М NaCl), pH 4,5, перемешивали 15 мин, центрифугировали 15 мин при 8000 об/мин и отделяли прозрачный раствор от нерастворившегося осадка (если последний имел место).

Реактив Шомоди [41] готовили, растворяя в 250 мл дистиллированной воды 30 г кристаллогидрата $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ и 12 г тартрата калия-натрия. Полученный раствор смешивали с 40 мл 10% CuSO_4 и добавляли 16 г безводного бикарбоната натрия, получая раствор I. Отдельно в 500 мл дистиллированной воды растворяли 18 г сульфата натрия и раствор кипятили в течение 1 ч (раствор II). Растворы I и II сливали и доводили до объема 1000 мл дистиллированной водой. Полученный реактив имеет голубой цвет. Срок хранения в темной посуде 2—3 мес.

Реактив Нельсона [42] готовили, растворяя 25 г молибдата аммония в 450 мл дистиллированной воды. К полученному раствору добавляли 25 мл концентрированной серной кислоты и 3 г арсената натрия и доводили общий объем дистиллированной водой до 500 мл. Раствор инкубировали при 36—40°С в течение 48 ч. Реактив имеет желтую или светло-зеленую окраску. Срок хранения 2—3 мес.

Определение концентрации D-глюкозы, образующейся в ходе ферментативной реакции, проводили глюкозооксидазно-пероксидазным методом [34], основанным на регистрации начальной скорости появления окрашенных продуктов окисления *o*-дианизидина, которые образуются в результате взаимодействия *o*-дианизидина с перекисью водорода, катализируемого пероксидазой. Перекись водорода, в свою очередь, образуется при окислении глюкозы растворенным в воде кислородом под действием глюкозооксидазы.

Глюкозооксидазно-пероксидазный реагент готовили, добавляя 0,01 мл запасного раствора пероксидазы в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,0 (в концентрации $2,75 \cdot 10^{-6}$ М, считая коэффициент экстинкции фермента при 403 нм равным $9,1 \cdot 10^{-4}$ М⁻¹см⁻¹, или с поглощением 0,25), к 50 мл раствора глюкозооксидазы (в концентрации 0,232 г/л) в том же буфере.

Раствор *o*-дианизидина ($2,5 \cdot 10^{-3}$ М) готовили, растворяя 6,2 мг вещества в 10 мл абсолютного этанола при перемешивании. Стандартные растворы *D*-глюкозы в 0,05 М ацетатном буфере (рН 4,5), 0,1 М NaCl выдерживали сутки перед использованием для построения калибровочного графика. Данные для построения калибровочного графика получали следующим образом: в 1-см кварцевую кювету помещали 2,15 мл глюкозооксидазно-пероксидазного реагента и 0,25 мл стандартного раствора глюкозы с концентрацией 0,01–0,40 г/л, добавляли 0,1 мл спиртового раствора *o*-дианизидина, перемешивали смесь и начинали регистрацию начальной скорости образования окрашенных продуктов окисления *o*-дианизидина с помощью спектрофотометра SP-1800 при 460 нм (шкала спектрофотометра 0–0,2, скорость движения ленты самописца 0,1 см/с). Определение зависимости начальной скорости окисления *o*-дианизидина от концентрации соответствующего раствора глюкозы показало, что линейный участок зависимости находится в диапазоне концентраций 0,01–0,20 г/л.

В дальнейшем глюкозооксидазно-пероксидазный реагент готовили ежедневно. Перед началом экспериментов проводили упрощенную калибровку, используя раствор глюкозы в концентрации 0,2 г/л в присутствии ферментного препарата. Содержание *D*-глюкозы в исследуемых растворах считывали по формуле

$$[G] = \frac{b}{a} \cdot 1,11 \cdot 10^{-3},$$

где $[G]$ — концентрация глюкозы в моль/л, a и b — начальные скорости образования продуктов окисления *o*-дианизидина (в моль/л·мин) для калибровочного и исследуемого раствора соответственно.

Определение скорости образования восстанавливающих сахаров проводили с использованием модифицированного метода Шомоди — Нельсона. Принцип метода состоит в первоначальном количественном окислении восстанавливающих сахаров, образовавшихся при ферментативном гидролизе целлюлозы, реактивом Шомоди в щелочной среде (рН 9) с образованием закиси меди и последующем окислении арсеномолибдатным реактивом Нельсона в кислой среде (рН 1,7–2,0) с образованием молибденовой сини, окраска которой устойчива в течение 24–36 ч.

Для построения калибровочных графиков и проверки реагентов в градуированные пробирки вносили по 0,5 мл реактива Шомоди и 0,5 мл раствора глюкозы (0,01–0,40 г/л), пробирки помещали на 40 мин в кипящую водяную баню, охлаждали, вносили в каждую по 0,5 мл реактива Нельсона, интенсивно встряхивали и содержимое пробирок доводили до 5 мл дистиллированной водой. Поглощение полученного окрашенного раствора определяли в 1-см кварцевой кювете при 610 нм относительно 0,05 М натрий-ацетатного буфера, обработанного реактивами Шомоди — Нельсона. Измерения проводили с использованием двухлучевого спектрофотометра Pye Unicam SP-1800. Линейный участок зависимости поглощения раствора от концентрации глюкозы лежит в диапазоне 0,01–0,2 г/л глюкозы. Для проверки реагентов, как правило, использовали раствор глюкозы в концентрации 0,1 г/л, для которого результирующее поглощение после обработки реактивами Шомоди — Нельсона должно находиться в пределах 0,85–1,0.

Определение скорости образования восстанавливающих сахаров при ферментативном гидролизе 1% раствора СМ-целлюлозы проводили, помещая в пробирку 2 мл 1,5% раствора СМ-целлюлозы в 0,05 М натрий-ацетатном буфере (содержащем 0,1 М NaCl), рН 4,5. Пробирку термостатировали 3–4 мин при 40° С и вводили 0,1–1 мл раствора фермента (в зависимости от активности) так, чтобы общий объем инкубационной смеси составлял 3 мл. Смесь перемешивали, отмечая время начала реакции по секундомеру, и отбирали первую пробу объемом 0,5 мл в пробирку с 0,5 мл

реактива Шомоди. Восстанавливающие сахара определяли как глюкозу по методике, описанной выше. Через определенные интервалы времени (5–30 мин) из реакционной смеси отбирали пробы объемом 0,5 мл и повторяли анализ по той же методике. Молярную концентрацию восстанавливающих сахаров ($[BC]$) определяли из данных калибровки по формуле

$$[BC] = 5,55 \cdot 10^{-4} D,$$

где D — поглощение результирующего окрашенного раствора при 610 нм. В каждом случае при расчетах учитывали содержание восстанавливающих сахаров в растворах фермента и исходного субстрата, проводя соответствующие контрольные опыты. Удельная активность препаратов целлюлаз, выражаемая в мкмольях восстанавливающих сахаров, образованных за 1 мин при гидролизе карбоксиметилцеллюлозы (1% раствор) при рН 4,5 (0,05 М натрий-ацетатный буфер, 0,1 М NaCl) и 40° С, в расчете на 1 г сухого препарата может быть рассчитана по формуле

$$A = \frac{555 D_t}{[E]_0 t},$$

где D_t — поглощение пробы, отобранной через t мин после реакции и обработанной реактивом Шомоди — Нельсона, $[E]_0$ — концентрация ферментного препарата в г/л. Точность данного метода определения активности ферментного препарата составляет 10%.

Определение скорости образования глюкозы при ферментативном гидролизе СМ-целлюлозы проводили глюкозооксидазно-пероксидазным методом, параллельно с определением восстанавливающих сахаров (см. выше), используя 1% раствор субстрата. При этом объем отбираемой пробы составлял 0,75 мл, т. е. 0,5 мл на определение сахаров, 0,25 мл — на определение глюкозы (0,05 М натрий-ацетатный буфер, 0,1 М NaCl, рН 4,5; 40° С). По разности между количеством восстанавливающих сахаров и количеством D -глюкозы находили количество восстанавливающих сахаров неглюкозного характера.

Определение общей активности целлюлазного комплекса по гидролизу фильтровальной бумаги проводили по методу Мандельс — Вебера [35, 36], основанного на регистрации образующихся восстанавливающих сахаров (как глюкозы) с помощью динитросалицилового реагента. За единицу активности в данном методе принимается активность такого количества ферментного препарата, которое образует 1 мкмоль восстанавливающих сахаров (как глюкозы) за 1 мин при гидролизе 50 мг фильтровальной бумаги Whatman No1 в 1 мл 0,05 М натрий-цитратного буфера, рН 4,8, при 50° С.

Для построения калибровочного графика по данному методу вносили в ряд градуированных пробирок по 1,5 мл стандартного раствора глюкозы с концентрацией 0,02–2,0 г/л, добавляли 3 мл динитросалицилового реагента, кипятили 5 мин, охлаждали до 20° С, доводили объем до 20 мл дистиллированной водой, после чего определяли поглощение при 550 нм (кювета сравнения содержала буфер, обработанный динитросалициловым реагентом). Было найдено, что линейный участок калибровочной кривой соответствует диапазону концентраций глюкозы 0,08–2,0 г/л.

Для определения общей активности целлюлаз 0,5 мл раствора ферментного препарата (в концентрации 1–5 г/л) вносили в градуированную пробирку, добавляли 1 мл 0,05 М натрий-цитратного буфера и в раствор опускали фильтровальную бумагу, сложенную в гармошку [36]. Реакционную систему термостатировали 1 ч при 50° С, добавляли 3 мл динитросалицилового реагента и проводили анализ как при построении калибровочного графика (см. выше). В качестве контроля использовали 1,5 мл раствора ферментного препарата (без бумаги), обработанного динитросалициловым реагентом.

Определение концентрации *D*-глюкозы и общих восстанавливающих сахаров, образующихся при ферментативном гидролизе фильтровальной бумаги, с помощью методов Шомоди — Нельсона и Мандельс — Вебера

Препарат (источник)	Глюкоза, * мкМ/мин·г	Восстанавливающие сахара, мкМ/мин·г	
		метод Шомоди — Нельсона	метод Мандельс — Вебера
<i>G. candidum</i>	110	270	430
Целлоксингин П10Х	10	20	24
<i>Asp. niger</i> (Sigma)	9,5	30	42
<i>Asp. niger</i> (Koch-Light)	5,2	25	35
<i>Thermoactinomyces</i> sp.	0,8	5,2	7,3

* Определено глюкозооксидазно-пероксидазным методом.

Специально проведенное сопоставление результатов метода Мандельс — Вебера, с одной стороны, и метода Шомоди — Нельсона, с другой, по определению количества восстанавливающих сахаров при гидролизе бумаги целлюлазными препаратами наряду с селективным определением образующейся глюкозы показало, что динитросалициловый метод Мандельс — Вебера дает несколько завышенные результаты (табл. 3). Это, по-видимому, связано с отсутствием четкой стехиометрии при количественном определении альдегидных групп моно- и олигосахаридов в методе Мандельс — Вебера, а также с более жесткими условиями обработки восстанавливающих сахаров в последнем методе. Помимо этого динитросалициловый метод отличается достаточно плохой воспроизводимостью, и ошибка при определении сахаров в двух параллельных пробах обычно составляет 15—20%. Все это позволяет рекомендовать использование метода Шомоди — Нельсона наряду с глюкозооксидазно-пероксидазным методом как предпочтительные для количественного определения восстанавливающих сахаров и отдельно *D*-глюкозы в продуктах ферментативного гидролиза целлюлозы и ее производных.

Определение «арил-β-глюкозидазной» активности основано на непрерывной спектрофотометрической регистрации образования *p*-нитрофенола при гидролизе *n*-нитрофенил-β-*D*-глюкопиранозида. За единицу принимали активность такого количества фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль *p*-нитрофенола за 1 мин при инкубации с $5 \cdot 10^{-4}$ М раствором *n*-нитрофенил-β-*D*-глюкопиранозида при рН 4,5 (0,05 М натрий-ацетатный буфер, 0,1 М NaCl) и 25° С.

В 1-см кварцевую кювету объемом 3 мл вносили раствор субстрата и буфера так, чтобы концентрация субстрата в кювете была $5 \cdot 10^{-4}$ М, добавляли раствор фермента (не более 0,1 мл), перемешивали и регистрировали скорость реакции на спектрофотометре с самописцем (Pye Unicam SP-1800) при 360 нм (шкала спектрофотометра 0—0,2, скорость движения ленты самописца — 0,02 см/с). Активность ферментного препарата рассчитывали по формуле

$$A = \frac{590 \operatorname{tg} \varphi}{[E]_0},$$

где $\operatorname{tg} \varphi$ — тангенс угла наклона прямой на ленте самописца (соответствующий начальной скорости реакции), $[E]_0$ — начальная концентрация ферментного препарата в кювете толщиной 1 см (в г/л), коэффициент рассчитан для разностного коэффициента молярной экстинкции $1,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ при 360 нм.

Определение эндоглюканазной активности. За единицу принимали активность такого количества фермента, которое расщепляет статистиче-

ским путем 1 мкмоль гликозидных связей за 1 мин в начальный период реакции с растворимым полимерным субстратом (0,2–0,4% раствор карбоксиметилцеллюлозы) при рН 4,5 (0,05 М натрий-ацетатный буфер, 0,1 М NaCl) и 40° С.

Для приготовления растворов субстрата 1,5 г СМ-целлюлозы добавляли к 100 мл натрий-ацетатного буфера (0,05 М, рН 4,5), содержащего 0,1 М NaCl, перемешивали 1 ч на магнитной мешалке с подогревом до 50–60° С, центрифугировали при 8000 об/мин и отделяли декантацией прозрачный раствор от густого студнеобразного осадка. Раствор разводили тем же буфером до рабочей концентрации 0,2–0,4% в зависимости от времени истечения используемого вискозиметра (должно быть 100–120 с). Ранее нами было показано, что в этих условиях определяемая эндоглюканазная активность не зависит от концентрации субстрата и его исходной вязкости [25]. Полученный раствор хранили не более 2 сут; при этом время истечения раствора изменялось не более чем на 5%.

В сухой вискозиметр (типа Оствальда или Убеллоде, объем верхнего шарика 3–4 мл, время истечения натрий-ацетатного буфера 20–45 с при 40° С), помещенный в прозрачный термостатируемый сосуд так, чтобы весь шарик находился под водой, вносили 5 мл 0,2–0,4% раствора СМ-целлюлозы. Через 3–5 мин, когда раствор субстрата принимал требуемую температуру (40° С), проводили измерение времени его истечения (τ_t). Затем с помощью микропипетки в раствор субстрата вводили 0,02–0,05 мл (в зависимости от активности) раствора ферментного препарата в том же буфере, одновременно тщательно перемешивали содержимое вискозиметра пробулькиванием воздухом при помощи резиновой груши, соединенной с узким коленом вискозиметра, и фиксировали время начала реакции по секундомеру. Через 0,5–1 мин определяли время истечения реакционной смеси и затем повторяли определения через каждые 3–5 мин. Активность вычисляли для нескольких различных концентраций ферментного препарата в реакционной смеси, чтобы убедиться, что удельная активность препарата не зависит от его концентрации. Если подобная зависимость наблюдалась (как правило, при слишком высоких концентрациях фермента кажущаяся удельная активность уменьшается при дальнейшем увеличении его концентрации), ферментный препарат разводили до тех пор, пока при дальнейшем уменьшении его концентрации удельная активность оставалась постоянной.

В тех случаях когда исходный раствор ферментного препарата имел сравнительно малую эндоглюканазную активность и необходимо было брать достаточно большие его объемы для введения в вискозиметр, для определения времени истечения раствора субстрата в отсутствие фермента проводили контрольные опыты, где вместо раствора фермента в субстрат вносили такой же объем буферного раствора (с той же вязкостью, что и раствор фермента). При этом учитывали, что концентрация СМ-целлюлозы в вискозиметре после добавления фермента не должна быть менее 0,2% при общем объеме реакционной смеси 5 мл.

Общая формула для расчета удельной эндоглюканазной активности для произвольного образца растворимого полимерного субстрата дана в работе [25]. Для СМ-целлюлозы, использованной в настоящей работе, эта формула имеет довольно простой вид:

$$A = \frac{14(\tau_0 - \tau_t)}{\tau_0 \left(t + \frac{\tau_t}{2} \right) (\tau_0 / \tau_0)^{1/2}} \cdot \frac{1}{[E]_0},$$

где A — активность эндоглюканазы на 1 г сухого препарата; τ_0 , τ_t и t — время истечения (с) соответственно чистого буферного раствора, исходного раствора субстрата (0,2–0,4%) и реакционной смеси через t мин после добавления фермента; t — время от начала реакции до начала изме-

рения; $[E]_0$ — концентрация ферментного препарата (г/л) в реакционной смеси. Величина $\tau_0 - \tau_t$ не должна превышать 0,1 τ_0 . Точность данного метода определения удельной активности эндоглюканаза соответствует 10%.

Определение целлобиазной активности. За единицу активности принимали активность такого количества фермента, которое приводит к гидролизу 1 мкмоль целлобиозы или к образованию 2 мкмоль глюкозы за 1 мин при инкубации с $2 \cdot 10^{-3}$ М раствором целлобиозы при pH 4,5 (0,05 М натрий-ацетатный буфер, 0,1 М NaCl) и 40° С.

Раствор целлобиозы (0,2 мл) с концентрацией $2 \cdot 10^{-2}$ М в 0,05 М натрий-ацетатном буфере (содержащем 0,1 М NaCl), pH 4,5, вносили в термостатируемый при 40° С сосуд, затем вводили 0,1--1,8 мл раствора фермента (в зависимости от активности) в том же буфере. Перед добавлением фермента в сосуд вводили натрий-ацетатный буфер (0,1 М NaCl) так, чтобы общий объем инкубационной смеси составлял 2 мл. Сразу после внесения раствора фермента смесь перемешивали, отмечали начало реакции по секундомеру, отбирали пробу 0,25 мл и вносили ее в 1-см кварцевую кювету, содержащую 2,15 мл глюкооксидазно-пероксидазного реагента (см. выше). Следующие пробы отбирали через 3—20 мин после начала реакции и проводили количественный анализ на содержание глюкозы. Высокое содержание глюкозы в первой (нулевой) пробе свидетельствует или о высокой целлобиазной активности ферментного препарата, или о значительной примеси глюкозы в исходных препаратах фермента или субстрата (целлобиозы). В этих случаях необходимо ставить контрольные опыты и использовать большие разбавления растворов. Активность целлобиазы рассчитывали по формуле

$$A = \frac{[G]_t - [G]_0}{2 [E]_0 t}$$

($[G]_0$ и $[G]_t$ — концентрации глюкозы (мкмоль/л) в нулевой пробе и отобранной через t мин после начала реакции, $[E]_0$ — начальная концентрация ферментного препарата (г/л) в инкубационной смеси) или по формуле

$$A = \frac{2,77 \cdot 10^3 (G_t - G_0)}{[E]_0 t},$$

где G^0 и G_t — концентрации глюкозы (г/л) в соответствующие моменты времени (см. выше). Величина $G_t - G_0$ не должна превышать 0,1 г/л. Следует отметить, что определение целлобиазной активности согласно данному методу проводится при концентрации целлобиозы $2 \cdot 10^{-3}$ М, близкой к значениям констант Михаэлиса для большинства целлобиаз из различных источников [28] и при которой не проявляется трансферазная активность ферментов. Точность метода составляет 10%.

Определение экзоглюкозидазной активности. За единицу активности принимали активность такого количества фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль *D*-глюкозы из СМ-целлюлозы под действием изучаемого целлюлазного комплекса (в присутствии эндоглюканазы и в отсутствие целлобиозы) за 1 мин в стационарном режиме ферментативной реакции (0,1% раствор карбоксиметилцеллюлозы) при pH 4,5 (0,05 М натрий-ацетатный буфер, 0,1 М NaCl) и 40° С. Активность экзоглюкозидазы определяли в присутствии других компонентов целлюлазного комплекса, варьируя активность добавляемой в реакционную систему целлобиазы и экстраполируя величины наблюдаемых скоростей образования *D*-глюкозы на гипотетическую систему, в которой активность целлобиазы отсутствует (см. рис. 1,2).

Растворы СМ-целлюлозы готовили так же, как и для определения активности эндоглюканазы (см. выше). Определение концентрации образующейся глюкозы в ходе ферментативной реакции определяли глюкозооксидазно-пероксидазным методом (см. выше).

В пять термостатируемых при 40° С сосудов, содержащих определенные объемы 0,05 М натрий-ацетатного буферного раствора, рН 4,5, вносили по 0,2 мл запасного раствора СМ-целлюлозы с концентрацией 15 г/л. Объемы буферного раствора подбирались таким образом, чтобы с учетом вносимых далее реагентов общий объем реакционной смеси был равен 3 мл. Первый сосуд предназначался для контрольного опыта по регистрации целлюлазной активности исследуемого целлюлазного препарата (в отсутствие вносимой дополнительно целлюлазы). Во 2—4-й сосуды вносили определенные количества целлюлазы из *Asp. foetidus* (или коммерческой β-глюкозидазы мивдаля) в том же буфере, подобранные таким образом, чтобы вносимая целлюлазная активность в данных сосудах соответственно была равна, превышала вдвое и втрое собственную целлюлазную активность исследуемого целлюлазного препарата (определяемую в предварительном опыте с первым сосудом). Пятый сосуд предназначался для контрольного опыта по образованию глюкозы из СМ-целлюлозы под действием вносимой целлюлазы (в отсутствие исследуемого целлюлазного препарата), и в него вносилось такое же количество целлюлазы, как и в 4-й сосуд.

После введения целлюлазы в 1—4-й сосуды вносили одинаковые объемы раствора исследуемого целлюлазного препарата (0,1—1 мл в зависимости от активности) в том же буфере, регистрировали начало реакции по секундомеру и из всех 5 сосудов отбирали нулевые пробы объемом 0,25 мл для регистрации глюкозы. В течение последующих 10—60 мин отбирали еще по три таких пробы, для каждого случая строили кинетическую кривую и определяли стационарную скорость образования *D*-глюкозы после завершения лаг-периода реакции (который был особенно заметен при сравнительно низкой эндоглюканазной активности в изучаемых препаратах целлюлаз). В выбранных нами условиях опыта реакция в 5-м сосуде даже при максимальных концентрациях целлюлазы не приводила к образованию заметных количеств глюкозы непосредственно из карбоксиметилцеллюлозы, и необходимости внесения соответствующих поправок в кинетические опыты не было.

Как было нами показано в отдельных опытах, величины констант Михаэлиса для целлюлаз из изученных нами целлюлазных препаратов по отношению к целлюлозе во всех случаях превышают (или равны) 10^{-3} М. Поэтому определение значений V/K_m целлюлаз проводилось определением их активностей при концентрации целлюлозы 10^{-4} М и соответствующим делением полученной активности на концентрацию субстрата. Величины V/K_m для целлюлаз изучаемых целлюлазных препаратов находили в отсутствие и в присутствии дополнительно добавляемой целлюлазы (см. рис. 1 и 2).

Определение целлюлогидролазной активности. За единицу активности принимали активность такого количества фермента, которое приводит к образованию 2 мкмоль *D*-глюкозы при гидролизе СМ-целлюлозы под действием изучаемого целлюлазного комплекса (в присутствии эндоглюканазы и избытка специально добавленной целлюлазы) за 1 мин в стационарном режиме реакции (0,1% раствор карбоксиметилцеллюлозы) при рН 4,5 (0,05 М натрий-ацетатный буфер, 0,1 М NaCl) и 40° С. Практически для определения целлюлогидролазной активности необходимо создать условия, когда стадией, лимитирующей скорость образования глюкозы, будет не гидролиз промежуточной целлюлозы, а ее образование. Это достигается добавлением в реакцию систему целлюлазы до того предела, когда стационарная скорость образования глюкозы перестает зависеть от концентрации добавляемой целлюлазы. Так как экзоглюкозидаза также образует глюкозу, активность целлюлогидролазы определяется по разности между предельной скоростью образования глюкозы в присутствии избытка целлюлазы и скоростью образования глюкозы под действием экзоглюкозидазы (см. выше). Используемые при этом максимальные концентра-

ции добавляемой целлюлазы могут превышать собственную целлюлазную активность исследуемого препарата в 10–100 раз.

Методика определения целлюбогидролазной активности аналогична определению активности экзогликозидазы, приведенной в предыдущем разделе. Пример определения приведен на рис. 2. Следует подчеркнуть, что описанная методика позволяет определять целлюбогидролазную *активность* компонентов целлюлазного комплекса, т. е. их способность образовывать целлюбозу при действии на целлюлолигосахариды (продукты гидролиза карбоксиметилцеллюлозы под действием эндогликаназы целлюлазного комплекса).

ЛИТЕРАТУРА

1. Reese E. T. (1975) in: Cellulose as a Chemical and Energy Resource, Symposium No. 5 of Biotechnology and Bioengineering (Wilke C. R., ed.), pp. 77–80, John Wiley and Sons, N. Y.
2. Клесов А. А., Рабинович М. Л. (1978) в сб.: Инженерная энзимология и биоорганический катализ (Кретович В. Л., Березин И. В., ред.), Итоги науки и техники, сер. «Биологическая химия», т. 12, ВИНТИ, с. 49–91. М.
3. Enzyme Nomenclature (1973) Recommendations of the IUPAC and the International Union of Biochemistry, Elsevier, Amsterdam.
4. Enzyme Nomenclature, Supplement 1 (1976) Biochim. et biophys. acta, 429, 1–45.
5. Selby K. (1969) in: Cellulases and Their Application (Gould R. F., ed.), vol. 95, pp. 34–52, Adv. Chem. Series, Washington.
6. Фениксова Р. В. (1972) Гидролитические ферменты микроорганизмов и их применение в народном хозяйстве, «Наука», М.
7. Гунова Н. А., Родионова И. А. (1972) Успехи биол. химии, 13, 179–200.
8. Reese E. T. (1976) in: Enzymatic Conversion of Cellulosic Materials: Technology and Application, Symposium No. 6 of Biotechnology and Bioengineering (Gaden E. L., Mandels M. H., Reese E. T., Spano L. A., eds), pp. 9–20, John Wiley and Sons, N. Y.
9. Enari T.-M., Markkanen P. (1977) Adv. Biochem. Engineering, vol. 5 (Ghose T. K., Fiechter A., Blakebrough N., eds.), pp. 1–24, Springer-Verlag, Berlin.
10. Ghose T. K. (1977) Adv. Biochem. Engng, 6, 39–76.
11. Ghose T. K., Ghosh P. (1978) J. Appl. Chem. Biotechnol., 28, 309–320.
12. Reese E. T. (1977) Recent Adv. Phytochem., 11, 311–341.
13. Reese E. T., Siu R. G. H., Levinson H. S. (1950) J. Bacteriol., 59, 485–497.
14. Emert G. H., Gum E. K., Lang J. A., Liu T. H., Brown R. D. (1974) Adv. Chem. Ser., 136, 79–100.
15. Ghose T. K., Das K. (1974) Adv. Biochem. Eng. (Ghose T. K., Fiechter A., eds), vol. 1, pp. 55–76, Springer-Verlag, Heidelberg.
16. Howell J. A., Stuck J. D. (1975) Biotechnol. Bioeng., 17, 873–893.
17. Huang A. A. (1975) Biotechnol. Bioeng., 17, 1421–1433.
18. Okazaki M., Moo-Young M. (1978) Biotechnol. Bioeng., 20, 637–663.
19. Howell J. A., Mangat M. (1978) Biotechnol. Bioeng., 20, 847–863.
20. Almin K. E., Eriksson K.-E. (1967) Biochim. et biophys. acta, 139, 238–247.
21. Almin K. E., Eriksson K.-E. (1967) Biochim. et biophys. acta, 139, 248–253.
22. Almin K. E., Eriksson K.-E., Pettersson B. (1975) Eur. J. Biochem., 51, 207–211.
23. Tschetkarov M., Koleff D. (1969) Monatsh. Chemie, 100, 986–997.
24. Hulme M. A. (1971) Arch. Biochem. and Biophys., 147, 49–54.
25. Рабинович М. Л., Клесов А. А., Березин И. В. (1977) Биоорг. химия, 3, 405–414.
26. Рабинович М. Л., Клесов А. А., Березин И. В. (1979) Докл. АН СССР, 246, 500–504.
27. Reese E. T. (1969) in: Cellulases and Their Application (Gould R. F., ed.), vol. 95, pp. 26–33, Adv. Chem. Series, Washington.
28. Klyosov A. A., Rabinowitch M. L. (1980) in: Enzyme Engineering: Future Directions (Wingard L. B., Berezin I. V., Klyosov A. A., eds), pp. 83–165, Plenum Press, N. Y.
29. Halliwell G., Griffin M. (1973) Biochem. J., 135, 587–594.
30. Berghem L. E. R., Pettersson L. G., Axiö-Fredriksson U.-B. (1975) Eur. J. Biochem., 53, 55–62.
31. Shikata S., Nisizawa K. (1975) J. Biochem., 78, 499–512.
32. Gum E. K., Brown R. D. (1976) Biochim. et biophys. acta, 446, 371–386.
33. Wood T. M., McCrae S. I. (1977) Carbohydr. Res., 57, 117–133.
34. Березин И. В., Рабинович М. Л., Спицын А. П. (1977) Биохимия, 42, 1631–1636.
35. Mandels M., Weber J. (1969) in: Cellulases and Their Application (Gould R. F., ed.), vol. 95, pp. 391–414, Adv. Chem. Series, Washington.
36. Mandels M., Andreotti R., Roche C. (1976) in: Enzymatic Conversion of Cellulosic Materials: Technology and Application, Symposium No. 6 of Biotechnology and Bioengineering (Gaden E. L., Mandels M. H., Reese E. T., Spano L. A., eds), pp. 21–33, John Wiley and Sons, N. Y.

37. Klyosov A. A. (1978) Proceedings of the Third Joint US/USSR Enzyme Engineering Seminar, National Science Foundation, pp. 378-409.
38. Шебека Г. Б., Маяускене Я. А., Паулюконис А. Б., Баранаускайте А. П., Василяускас Ю. Ф. (1978) в сб.: Методы получения высокоочищенных ферментов, Тез. Всес. симпоз., с. 52, Вильнюс.
39. Юрьев Ю. К. (1957) Практические работы по органической химии, т. 2, с. 193. Изд. МГУ, М.
40. Miller G. L. (1959) *Analyt. Chem.*, 31, 426-428.
41. Somogyi M. J. (1952) *J. Biol. Chem.*, 195, 19-23.
42. Nelson N. (1944) *Biochem. J.*, 153, 375-380.

Поступила в редакцию
24.IX.1979

**ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CELLULOSE.
I. ACTIVITY AND COMPOSITION
OF CELLULOSE COMPLEXES FROM VARIOUS SOURCES**

KLYOSOV A. A., RABINOVITCH M. L., SINITSYN A. P.,
CHURILOVA I. V., GRIGORASH S. Yu.

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

The theoretical and practical approaches for determining the specific activities of all four principal components of cellulase complexes, i.e. endoglucanase, exoglucosidase, cellobiohydrolase, and cellobiase were developed. The qualitative and quantitative data on the composition of 30 cellulase complexes for various sources were obtained. The correlations were traced between the component activities and total (effective) activities of the cellulase complexes.