



УДК 577.154

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

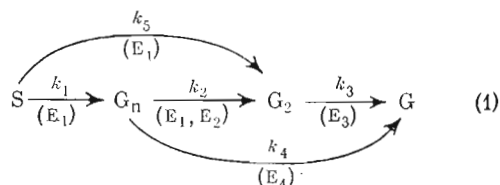
III. * ЗАКОНОМЕРНОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ ГЛЮКОЗЫ И ЦЕЛЛОБИОЗЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПОЛИФЕРМЕНТНЫХ ЦЕЛЛЮЛАЗНЫХ СИСТЕМ НА НЕРАСТВОРИМУЮ (ПРИРОДНУЮ) ЦЕЛЛЮЛОЗУ.

Блесов А. А., Григораш С. Ю.

Химический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

Выявлены основные пути образования глюкозы и целлобиозы в ходе ферментативного превращения нерастворимой целлюлозы. Иллюстрация кинетических закономерностей гидролиза в нестационарных и стационарных режимах реакции проведена с использованием 10 полиферментных целлюлазных комплексов из грибов рода *Trichoderma*, *Geotrichum* и *Aspergillus*, а также препарата *Rapidase*. Получены данные, убедительно свидетельствующие в пользу единого механизма гидролиза целлюлозы под действием целлюлазных комплексов независимо от их состава и происхождения.

Ферментативный гидролиз целлюлозы происходит в результате последовательно-параллельного действия нескольких ферментов, входящих в состав так называемого целлюлазного комплекса [2—6]. Общая кинетическая схема действия целлюлолитических ферментов на природную целлюлозу может быть представлена в следующем достаточно упрощенном виде [4, 5]:



Эта схема принципиальна и отражает лишь основные пути гидролитической деградации целлюлозы. Эндоглюканаза (E₁) (КФ 3.2.1.4) атакует исходный нерастворимый субстрат (S), приводя к образованию целлоолигосахаридов различной степени полимеризации (G_n), а также целлобиозы (G₂). Помимо этого целлобиоза может образовываться в виде продукта специфического действия целлобиогидролазы (E₂) (КФ 3.2.1.91) на те же олигосахариды [2, 6]. Целлобиоза гидролизруется до конечного продукта реакции, глюкозы (G), под действием еще одного фермента целлюлазного комплекса — целлобиазы (E₃) (КФ 3.2.1.21). Наконец, четвертый целлюлолитический фермент, экзоглюкозидаза (E₄) (КФ 3.2.1.74), шунтирует

* Сообщение II см. [1].

полиферментную систему, превращая промежуточные целлоолигосахариды непосредственно в глюкозу [7—11].

Схема 1 отражает лишь основные пути гидролиза целлюлозы. В ней не показаны процессы образования и превращения соответствующих фермент-субстратных комплексов, ингибирование или активация ферментов промежуточными метаболитами и продуктами гидролиза (см. [12, 13]), адсорбция целлюлаз на поверхности субстрата [4, 14] и связанные с этим регуляторные явления [15] и т. д. Изучая данные закономерности, мы пришли к выводу [5, 7, 8, 16], что схема 1 является общей для ферментативного гидролиза целлюлозы независимо от состава целлюлазных комплексов и их происхождения. Опыт свидетельствует, что практически все многообразие кинетических закономерностей ферментативного превращения целлюлозы и ее производных можно объяснить в рамках схемы 1, а также ее более конкретных вариантов.

Развивая эту концепцию, в настоящей работе мы провели рассмотрение кинетики действия полиферментных целлюлазных систем по отношению к нативной целлюлозе в нестационарном режиме реакции. Литература по нестационарной кинетике полиферментных систем практически вся посвящена биферментным реакциям или линейным цепям (см. [17—19]). Поэтому основной задачей настоящей работы было выяснить, в какой мере общая схема реакции 1 пригодна для кинетического описания гидролиза природной целлюлозы под действием различных целлюлазных комплексов в нестационарном режиме реакции. Основное содержание разработанной кинетической теории нестационарных последовательно-параллельных полиферментных систем на примере ферментативного гидролиза целлюлозы было опубликовано недавно в работе [20]. Здесь же мы рассмотрим практическую сторону вопроса, ограничившись минимумом кинетических уравнений и преобразований.

Ранее нами было показано [4, 5], что при гидролизе целлюлозы под действием целлюлазных комплексов различного происхождения образование глюкозы всегда характеризуется определенным индукционным периодом (лаг-периодом). Это указывает на то, что глюкоза не образуется непосредственно из исходного субстрата (под действием, например, эндоглюканазы или экзоглюкозидазы), а является продуктом последующей деградации промежуточных метаболитов целлюлазной системы (см. схему 1). При увеличении продолжительности реакции зависимость концентрации образующейся глюкозы от времени асимптотически приближается к прямой, угловой коэффициент которой равен стационарной скорости процесса (рис. 1). При этом период индукции (τ) определяется отрезком, отсекаемым на оси асимптотической прямой, и задается следующим выражением [20]:

$$\tau = \frac{V_5/V_{15}}{k_3} + \frac{V_1/V_{15}}{k_3 \left(1 + \frac{k_4}{k_2} - \frac{k_3}{k_2}\right)} + \frac{V_1/V_{15}}{k_4 \left(1 + \frac{k_2}{k_4}\right) \left(1 + \frac{k_2}{k_4 - k_3}\right)}. \quad (2)$$

Здесь V_1 и V_5 — максимальные скорости реакции на отдельных стадиях ферментативного гидролиза целлюлозы (схема 1), причем здесь и далее индекс 1 соответствует действию эндоглюканазы (E_1) на исходный субстрат, индекс 2 — действию целлобиогидролазы (E_2) и (или) эндоглюканазы на целлоолигосахариды с образованием целлобиозы, индекс 3 — действию целлобиазы (E_3) на целлобиозу, индекс 4 — действию экзоглюкозидазы (E_4) на целлоолигосахариды, индекс 5 — стадии образования целлобиозы при действии эндоглюканазы непосредственно на исходный субстрат (верхний путь на схеме 1), $V_{15} = V_1 + V_5$. Постоянные k_i ($i=2, 3, 4$) соответствуют константам скоростей псевдопервого порядка превращения промежуточных метаболитов (олигосахаридов и целлобиозы) при условии, что концентрации последних в ходе реакции малы по сравнению

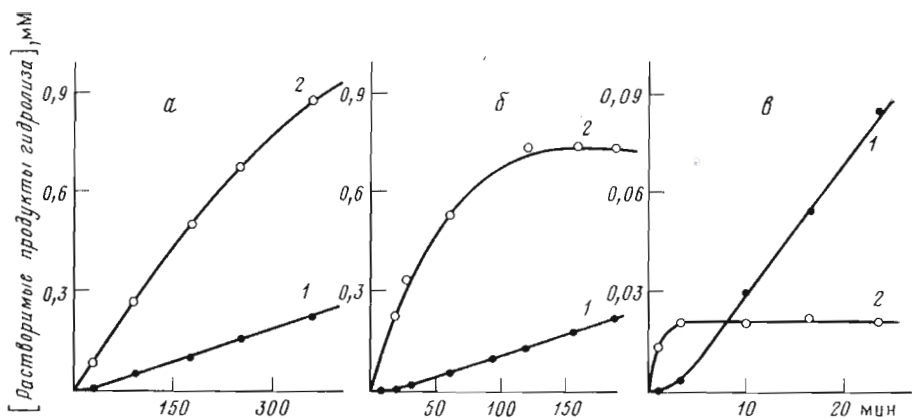


Рис. 1. Кинетические кривые образования глюкозы (1) и целлобиозы (2) в ходе гидролиза хлопкового линта под действием целлюлазных комплексов из *T. reesei*, 0,05 г/л (а), *G. candidum* II, 0,01 г/л (б) и *Asp. niger* (Serva), 1 г/л (в). Концентрации субстрата (г/л): а - 1, б - 7, в - 1

с соответствующими значениями констант Михаэлиса. Выражение (2) было выведено в условиях превращения исходного субстрата на небольшую глубину и принимая однородное распределение ферментов и субстратов в реакционной системе. Как показано в работе [20], эти условия достаточно легко соблюдаются в реальном эксперименте.

В принципе при рассмотрении кинетики ферментативного гидролиза целлюлозы следует учитывать возможность протекания реакций трансглюкозилирования [1, 2, 12, 21]. Не исключено, что образование небольших количеств целлотриозы в ходе гидролиза нерастворимой целлюлозы, обнаруженное в нескольких работах [22, 23], объясняется именно трансглюкозилированием. Однако при действии целлюлазных комплексов, используемых в настоящей работе, в растворе были обнаружены только глюкоза и целлобиоза, как было специально показано хроматографическими методами [16] (см. также [24]). Далее, как нами ранее было показано, целлобиоза может вступать в реакции трансглюкозилирования при концентрациях порядка 10 мМ и выше [1, 12, 25], что намного (на один-два порядка) превышает концентрации промежуточной целлобиозы, образующейся в ходе кинетических экспериментов в настоящей работе (см. далее рис. 1, 2 и 4). Наконец, в работах [12, 25] было показано, что глюкоза вообще не вступает в реакции трансглюкозилирования под действием целлюлаз (во всяком случае, вплоть до концентрации 30 мМ). Совокупность этих данных позволяет утверждать, что реакции трансглюкозилирования не вносят сколько-нибудь заметный вклад в кинетику образования растворимых продуктов реакции ферментативного гидролиза нерастворимой целлюлозы в изученных здесь случаях и не учитывались при дальнейшем кинетическом анализе.

Несмотря на достаточную сложность выражения (2), его рассмотрение даже в общем виде и сопоставление с данными эксперимента позволило сделать заключение о применимости на практике основных допущений и приближений, сделанных при его выводе [20]. Однако для расчетов констант скоростей отдельных стадий ферментативного гидролиза целлюлозы это уравнение целесообразно привести к более конкретным формам, поскольку не для всех целлюлазных комплексов все пути на схеме реакции (1) являются значимыми [7, 8, 16]. Специальное изучение вопроса о характере стадий, лимитирующих скорость образования глюкозы под действием целлюлазных препаратов из различных источников, проведено нами в работах [8, 16], где показано, что в зависимости от качественного и количественного состава целлюлазных комплексов на практике наблю-

Активности отдельных компонентов и кинетические характеристики целлюлазных комплексов из различных источников (рН 4,5; 40° С)

Источник	Удельные активности компонентов целлюлазных препаратов, ед/г ^{1*}			A ₃ /A ₁	Вклад экзоглюкозидазы в образование глюкозы ^{2*} , %	Характеристика препаратов ^{1*}
	Эндоглюкозидаза (A ₁)	Целлобиаза (A ₂)	Экзоглюкозидаза (A ₃)			
<i>Geotrichum candidum</i> ^{3*} I	3000	60	250	0,02	86	Дефицит по целлобиазе
<i>Trichoderma reesei</i>	600	20	100	0,03	98	
Rapidase	520	1	6	0,002	95	
<i>G. candidum</i> II	4000	1000	800	0,25	68	Относительно сбалансированные комплексы
<i>T. koningii</i>	60	10	16	0,17	51	
<i>T. lignorum</i>	830	270	200	0,32	55	
<i>T. longibrachiatum</i>	1100	70	175	0,07	60	
<i>Asp. niger</i> (Serva)	100	560	<3	5,6	<3	Дефицит по экзоглюкозидазе
<i>Asp. niger</i> (Koch-Light)	270	27	<0,5	0,1	<3	
<i>Asp. foetidus</i>	190	3900	<3	20	<3	

^{1*} 1 ед. акт. соответствует превращению 1 мкмоль субстрата (в случае экзоглюкозидазы — образованию 1 мкмоль глюкозы) за 1 мин.

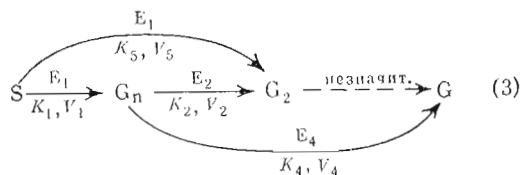
^{2*} При гидролизе растворимой СМ-целлюлозы (1%).

^{3*} Препарат специально обеднен целлобиазой при очистке.

даются три основных типа кинетических кривых образования растворимых продуктов ферментативного гидролиза целлюлозы (глюкозы и целлобиозы) на относительно малых глубинах реакции.

Примеры таких кривых для ряда целлюлазных препаратов, изученных в настоящей работе (табл. 1), приведены на рис. 1. В первом случае концентрация промежуточной целлобиозы непрерывно увеличивается в ходе реакции, не выходя за время эксперимента на стационарный режим, в то время как стационарная скорость образования глюкозы устанавливается достаточно быстро (рис. 1а). Подобная закономерность свойственна целлюлажным препаратам, дефицитным по целлобиазе, но обычно имеющим сравнительно высокую (по сравнению с целлобиазой) экзоглюкозидазную активность (табл. 1, первая группа препаратов). Во втором типичном случае кинетических закономерностей концентрация промежуточной целлобиозы выходит на стационарный уровень через некоторое время после начала реакции, но это характеристическое время заметно превышает лаг-период образования глюкозы (рис. 1б). Эти закономерности наблюдаются для целлюлазных препаратов, относительно сбалансированных по компонентам (табл. 1, вторая группа). Наконец, характерная особенность третьего случая — почти одновременный выход концентрации промежуточной целлобиозы и скорости образования глюкозы на стационарный (не зависящий в определенных пределах от времени) уровень, причем стационарная концентрация целлобиозы здесь довольно низкая (рис. 1в). Эти закономерности свойственны для препаратов, дефицитных по экзоглюкозидазе и достаточно активных по целлобиазе (табл. 1, третья группа). Представляет интерес проанализировать кинетический смысл и причины найденных закономерностей, выявить упрощенные формы выражения (2) для лаг-периода образования глюкозы и численно рассчитать соответствующие константы скоростей на отдельных стадиях ферментативного гидролиза целлюлозы.

При дефиците целлобиазы в целлюлазных комплексах схему 1 можно представить в следующем виде:



где K_1 – K_5 – эффективные константы Михаэлиса.

Как видно из рис. 1а, даже в том случае, когда концентрация промежуточной целлобиозы непрерывно возрастает в ходе опыта, величина лаг-периода по глюкозе достаточно мала. Поскольку в реакциях целлюлазных комплексов, дефицитных по целлобиазе (схема 3), обычно выполняется соотношение $k_4 \gg k_3$, выражение для лаг-периода по глюкозе (2) приобретает вид

$$\tau = \frac{V_5/V_{15}}{k_3} + \frac{V_1/V_{15}}{k_3 \left(1 + \frac{k_4}{k_2} - \frac{k_3}{k_2}\right)} + \frac{V_1/V_{15}}{k_4 \left(1 + \frac{k_2}{k_4}\right)^2}. \quad (4)$$

Если при этом константа k_2 велика ($k_2 \gg k_4$, $k_2 \gg k_3$), величина лаг-периода по глюкозе составляет $1/k_3$ и приблизительно равна времени выхода системы на стационарный режим по целлобиазе (которое чрезвычайно велико, если вообще существует для изученных здесь комплексов, дефицитных по целлобиазе). Это поведение явно не согласуется с данными рис. 1а, и, следовательно, соотношение $k_2 \gg k_4$ для подобных систем не выполняется (отношение k_2 и k_3 не играет здесь существенной роли). Поэтому для изученных здесь целлюлазных препаратов, дефицитных по целлобиазе, скорее выполняется условие $k_4 \gg k_2$ наряду с условием $k_4 \gg k_3$, и тогда схема (3) может быть упрощена до (5):



Кинетический анализ схемы (5) в условиях превращения исходной целлюлозы на небольшую глубину приводит к простому выражению для лаг-периода по глюкозе

$$\tau = K_4/V_4. \quad (6)$$

Итак, при дефиците целлобиазы в целлюлазных комплексах, когда соотношение (7) не выполняется:

$$v_2 + v_5 < V_3 \quad (7)$$

(v – текущие скорости образования целлобиозы, индексы соответствуют принятым ранее) и на практике наблюдается непрерывное накопление целлобиозы в ходе реакции (рис. 1а), величина лаг-периода по глюкозе может быть достаточно мала и определяться только кинетическими параметрами действия экзоглюкозидазы (выражение 6).

Поскольку экзоглюкозидазная активность целлюлазных препаратов может быть непосредственно измерена на опыте с использованием растворимого полимерного субстрата, карбоксиметилцеллюлозы (табл. 1), представляется возможным экспериментально проверить теоретические выводы настоящего раздела. Так, если верна формула (6), величина лаг-периода по глюкозе, измеренная в реакциях гидролиза нерастворимой целлюлозы под действием различных целлюлазных препаратов, дефицитных по целлобиазе (табл. 1), должна быть обратно пропорциональна экзоглюкозидазной активности этих препаратов (естественно, при условии,

Взаимосвязь между экзоглюкозидазной активностью (A_4) целлюлазных комплексов из различных источников и соответствующими величинами индукционных периодов (τ) образования глюкозы в реакциях гидролиза нерастворимой целлюлозы (хлопковый линт)
Концентрация субстрата 5 г/л

Источник	$1/\tau$ ^{1*} , мин ⁻¹ ·г ⁻¹ ·л	$A_4: \frac{1}{\tau}$, мкМ	$\frac{V_3}{K_3}$ ^{2*} , мин ⁻¹ ·г ⁻¹ ·л
<i>G. candidum</i> I	2	125	0,06
<i>T. reesei</i> Rapidase	0,7 0,04	140 150	0,02 0,001
<i>G. candidum</i> II	5	160	0,9
<i>T. koningii</i>	0,1	160	0,01
<i>Asp. niger</i> (Serva)	0,4	(<8)	0,8
<i>Asp. niger</i> (Koch-Light)	0,1	(<5)	0,03

^{1*} Получено из зависимости (τ , $1/[E]_0$) как котангенс угла наклона в расчете на концентрацию ферментного препарата 1 г/л; в соответствии с уравнением (6) $1/\tau = V_4/K_4$.

^{2*} Найдено в отдельном эксперименте по гидролизу целлобиозы.

что механизм действия экзоглюкозидаз целлюлазных комплексов из различных источников одинаков). Предсказанная зависимость τ от активности экзоглюкозидаз действительно наблюдается на опыте (табл. 2). Для всех рассмотренных случаев (первые пять препаратов в табл. 2) отношения экзоглюкозидазной активности различных целлюлазных препаратов и величины $1/\tau$ почти постоянно и равно 150 ± 10 мкМ*. Более того, выяснилось, что подобная закономерность выполняется не только для целлюлазных комплексов, дефицитных по целлобиазе (*G. candidum* I, *T. reesei*, Rapidase), но и для относительно сбалансированных по составу комплексов (*G. candidum* II, *T. koningii*). Таким образом, и в последнем случае величина лаг-периода по глюкозе определяется действием экзоглюкозидазы и дается формулой (6). Причины этого явления рассмотрены ниже, при анализе кинетического поведения сбалансированных комплексов. Корреляции между $1/\tau$ и целлобиазной активностью целлюлазных препаратов, приведенных в табл. 2, не наблюдается (ср. табл. 1).

В табл. 2 приведены также значения отношений V_3/K_3 , определенные из независимых экспериментов по гидролизу целлобиозы под действием изученных целлюлазных препаратов. Как видно, величины V_4/K_4 (первая колонка в табл. 2) целлюлазных комплексов, дефицитных по целлобиазе (первые три препарата), действительно превосходят величины V_3/K_3 в 30–40 раз (как показано в статье [15], а также упоминается далее, это отношение в присутствии нерастворимой целлюлозы значительно выше и превышает два десятичных порядка за счет адсорбции целлобиазы на целлюлозе с существенной потерей активности). Итак, рассматривая всю совокупность приведенных в настоящем разделе данных, как теоретических, так и экспериментальных, можно заключить, что для целлюлазных комплексов, дефицитных по целлобиазе и относительно сбалансированных (см. ниже), действительно выполняются соотношения $k_4 \gg k_2$, $k_4 \gg k_3$ (в присутствии нерастворимого субстрата) и величина лаг-периода по глюкозе (см. рис. 1а и б) может быть использована для численного

* Численное значение данного отношения выражается достаточно сложной функцией, зависящей в свою очередь от отношения максимальных скоростей гидролиза олигосахаридов хлопкового линта и карбоксиметилцеллюлозы, констант Михаэлиса относительно этих двух субстратов и от абсолютной концентрации карбоксиметилцеллюлозы, использованной при определении экзоглюкозидазной активности.

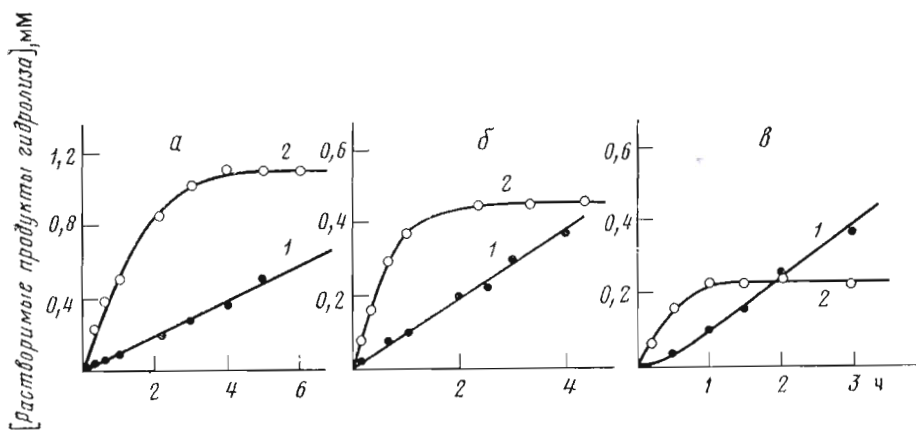


Рис. 2. Кинетические кривые образования глюкозы (1) и целлобиозы (2) в реакциях гидролиза микрокристаллической целлюлозы (30 г/л) под действием целлюлазных комплексов из *T. longibrachiatum* (а) и *T. lignorum* (б), а также гидролиза хлопкового линта (1 г/л) под действием целлюлазного комплекса из *T. koningii* (в). Концентрации ферментных препаратов (г/л): а — 0,03, б — 0,03, в — 1

определения экзоглюкозидазной активности таких комплексов с помощью формулы (6).

Рассмотрим теперь кинетическое поведение целлюлазных комплексов, относительно сбалансированных по составу, для которых выполняется соотношение (7). В этом случае через определенное время после начала реакции концентрации промежуточной целлобиозы (схема 1) достигает такого уровня, что скорость ее расхода (под действием целлобиазы) становится равной скорости ее накопления (под действием эндоглюканазы и/или целлобиогидролазы) и в системе устанавливается стационарный режим по целлобиозе. Подобное кинетическое поведение системы качественно согласуется с данными рис. 1б. Однако количественное рассмотрение экспериментальных данных приводит к выводу, что кинетические закономерности действия целлюлазных систем в реальных условиях более сложны. Так, если бы степень конверсии исходного субстрата (рис. 1б) была достаточно мала и субстрат был бы однороден по составу и реакционной способности, выход промежуточной целлобиозы на стационарный режим действительно был бы обусловлен установлением равенства скоростей образования целлобиозы и превращения ее в глюкозу. В этом случае стационарная скорость образования глюкозы (после установления стационарной концентрации целлобиозы) должна по меньшей мере вдвое превышать начальную скорость образования целлобиозы (поскольку одна молекула целлобиозы при гидролизе превращается в две молекулы глюкозы). Более того, скорость образования глюкозы должна быть еще выше, поскольку глюкоза образуется не только из целлобиозы (под действием целлобиазы), но и непосредственно из нерастворимых целлоолигосахаридов (под действием экзоглюкозидазы). Однако скорость образования глюкозы приблизительно одинакова до и после установления стационарного режима по целлобиозе и меньше начальной скорости образования целлобиозы приблизительно в 3 раза (рис. 1б). Аналогичное поведение «сбалансированных» целлюлазных комплексов наблюдалось во всех изученных системах. Например, при гидролизе микрокристаллической целлюлозы под действием комплекса из *T. longibrachiatum* стационарная скорость образования глюкозы была в 6 раз меньше начальной скорости образования целлобиозы, под действием комплекса из *T. lignorum* — в 4,5 раза, при гидролизе хлопкового линта под действием комплекса из *T. koningii* — в 3 раза (рис. 2).

Полученные данные явно не согласуются с наиболее простым объяс-

нением причин установления стационарного режима, приведенным выше для идеализированного случая (малый расход субстрата; исходный субстрат однороден по составу и реакционной способности; глюкоза в равной мере образуется под действием целлюбиазы и экзоглюкозидазы, как это наблюдается для гидролиза растворимых полимерных субстратов, см. табл. 1). В связи с этим можно предложить гипотезу, которая дает единую интерпретацию экспериментальным данным и включает в себя следующие положения.

1. Допущение о малой степени конверсии нерастворимой целлюлозы в реальных условиях, как правило, не выполняется (по крайней мере для тех глубин превращения исходного субстрата, когда промежуточная целлюбиоза выходит на «стационарный» режим). Это обусловлено неоднородностью субстрата и деградацией в первую очередь его легкодоступных участков, которые составляют лишь относительно небольшую весовую долю субстрата. Поэтому скорость образования целлюбиозы при ферментативном гидролизе нерастворимой целлюлозы (хлопковый линт, микрокристаллическая целлюлоза) достаточно быстро падает уже на начальных этапах реакции, приводя к установлению «стационарного» режима реакции (рис. 1б, 2). Иначе говоря, «стационарный» (или псевдостационарный) уровень промежуточной целлюбиозы устанавливается не столько в результате увеличения скорости ее последующего гидролиза (под действием целлюбиазы), сколько из-за уменьшения скорости ее образования. Именно это положение объясняет экспериментальные факты, которые обсуждаются выше при рассмотрении рис. 1б и 2. Напротив, установление стационарной скорости образования глюкозы и связанные с этим кинетические закономерности (установление стационарной концентрации промежуточных олигосахаридов, зависимость лаг-периода по глюкозе от начальных концентраций субстрата и ферментного препарата [20] и т. д.) соответствуют столь малой степени конверсии нерастворимой целлюлозы (рис. 1, 2), что это основное приближение ($[S] \approx [S]_0$) в данном случае можно считать действительным и соответствующие расчеты — достаточно корректными.

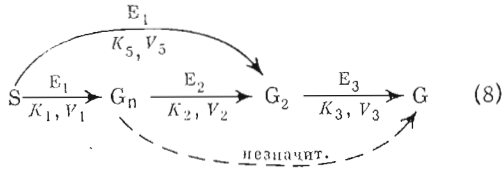
2. Целлюбиазная активность целлюлазных комплексов в присутствии нерастворимой целлюлозы выражена в значительно меньшей степени, чем активность тех же комплексов в реакции гидролиза целлюбиозы в отсутствие нерастворимого субстрата. Это положение необходимо для объяснения того факта, что целлюбиоза, образующаяся из целлюлозы в начальный период реакции, лишь в незначительной степени превращается далее в глюкозу (рис. 1б, 2), хотя концентрации G_2 и тем более G в данном случае слишком малы для проявления ингибирования продуктами реакции [13]. Изучение этого явления действительно показало, что целлюбиоза адсорбируется на поверхности целлюлозы с существенной потерей активности (см. [15]).

3. В отличие от ферментативного гидролиза растворимой целлюлозы, где относительно сбалансированные по составу целлюлазные комплексы образуют глюкозу примерно в равной степени под действием целлюбиазы и экзоглюкозидазы (см. табл. 1), в реакциях гидролиза нерастворимой целлюлозы те же комплексы образуют глюкозу в основном под действием экзоглюкозидазы. Это положение вытекает из предыдущего и было экспериментально показано нами ранее для гидролиза микрокристаллической целлюлозы [16]. Данное явление в свою очередь приводит к тому, что накопление промежуточной целлюбиозы практически не вызывает увеличения стационарной скорости образования глюкозы (рис. 1б, 2).

Последние два положения позволяют заключить, что основные кинетические закономерности образования глюкозы из нерастворимой целлюлозы должны быть сходными для относительно сбалансированных целлюлазных комплексов и для комплексов, дефицитных по целлюбиазе (схемы и уравнения 3—6). Это, по-видимому, объясняет обнаруженную выше

закономерность, что для целлюлазных препаратов, принадлежащих обеим группам, величина лаг-периода по глюкозе определяется одним и тем же выражением $\tau = K_4/V_4$ и, следовательно, для всех данных целлюлазных комплексов (в присутствии нерастворимого субстрата) выполняются соотношения $k_4 \gg k_2$ и $k_4 \gg k_3$ (см. выше).

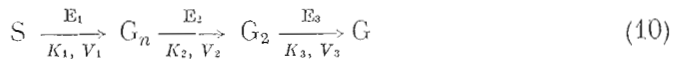
Перейдем теперь к третьему виду кинетических зависимостей ферментативного гидролиза целлюлозы (рис. 1б), для которых характерно относительно высокое содержание в системе целлобиазы и малое — экзогликозидазы (табл. 1). В этом случае схема (1) превращается в (8):



Здесь явно выполняется соотношение (7), и реакция достаточно быстро выходит на стационарный уровень промежуточной целлобиозы (как правило, при достаточно малой ее концентрации). Кинетические следствия реакций целлюлазных препаратов, дефицитных по экзогликозидазе (табл. 1), сводятся в основном к тому, какой путь образования глюкозы преобладает — биферментный путь «эндоглиюканаза — целлобиаза»



(верхний путь на схеме 8) или трехферментный путь «эндоглиюканаза — целлобиогидролиза — целлобиаза»

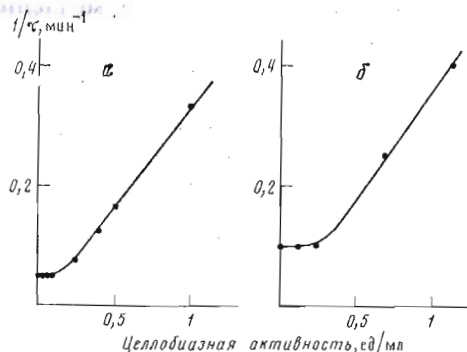


(центральный путь на схеме 8). Кинетический анализ [20] в первом случае (9) показывает, что как время выхода промежуточной целлобиозы на стационарный режим, так и величина лаг-периода образования глюкозы определяется кинетическими параметрами действия целлобиазы (обработка проводится аналогично схеме 5, см. выше). Во втором случае (10) эти времена в общем случае определяются действием двух ферментов — целлобиогидролазы (E_2) и целлобиазы (E_3), причем наиболее медленная стадия ($k_2 \gg k_3$ или $k_2 \ll k_3$) определяет лаг-период и время установления стационарного режима по целлобиозе (см. выражение 2).

Поскольку целлобиогидролазные активности препаратов, изучаемых в настоящей работе, неизвестны, сделать выбор между схемами (9) и (10) или между неравенствами $k_2 \gg k_3$ и $k_2 \ll k_3$ на первый взгляд не представляется возможным. Однако нами показано, что изучение кинетики ферментативного образования глюкозы из целлюлозы позволяет решить данную проблему. Для этого были изучены зависимости лаг-периодов по глюкозе под действием ряда целлюлазных препаратов от количества специально добавляемой очищенной целлобиазы (из *Asp. foetidus*). На рис. 3 показаны подобные зависимости для относительно сбалансированного целлюлазного препарата из *G. candidum* (II) и препарата из того же источника, дефицитного по целлобиазе. Как видно, вплоть до определенного уровня целлобиазной активности в системе величина лаг-периода в обоих случаях остается постоянной и определяется кинетическими параметрами действия экзогликозидазы (V_4/K_4 , табл. 2). Иначе говоря, на этом участке кривой должны выполняться соотношения

$$k_4 \gg k_2, \quad k_4 \gg k_3 \quad (11)$$

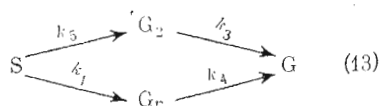
Рис. 3. Влияние количества (активности) добавляемой целлюбиазы (из *Asp. foetidus*) на величину лаг-периода образования глюкозы при гидролизе хлопкового линта под действием целлюлазных препаратов из *G. candidum* II, 0,01 г/л (а) и *G. candidum* I, 0,05 г/л (б). Концентрация исходной целлюлозы в обоих случаях 5 г/л



(см. выше). При дальнейшем добавлении целлюбиазы в систему величина лаг-периода начинает уменьшаться, причем пропорционально увеличению целлюлазной активности (рис. 3). Это означает, что на данном участке кривой лаг-период определяется уже действием целлюбиазы. Следовательно, основной вклад в образование глюкозы здесь дает целлюбиаза (а не экзоглюкозидаза) и должны выполняться соотношения

$$k_2 \gg k_3 \gg k_4 \quad (12)$$

(если гидролиз целлюлозы проходит в соответствии со схемой (10)). Не трудно видеть, что неравенства (11) и (12) несовместимы и, следовательно, схема (10) неприменима для описания экспериментальных данных. Действительно, в соответствии со схемой (10) лаг-период по глюкозе определяется медленнейшей стадией реакции (k_2 или k_3), и, поскольку на практике он определяется действием целлюбиазы (рис. 3), k_2 должна быть велика по сравнению с константами k_3 и k_4 . С другой стороны, проведенный выше кинетический анализ действия целлюлазных препаратов (дефицитных по целлюбиазе и сбалансированных) указывает на то, что константа k_2 мала по сравнению с k_4 . Наиболее приемлемое разрешение этого противоречия заключается в том, что на ранних стадиях ферментативного гидролиза целлюлозы статистическое превращение целлюлозосахаридов в целлюбозу (под действием целлюбиогидролазы, E_2) незначимо, и путь реакции (10) не вносит заметного вклада в ферментативное превращение целлюлозы. Иначе говоря, образование глюкозы из целлюлозы под действием изученных в настоящей работе целлюлазных препаратов осуществляется двумя параллельными путями (5) и (9), составляя в общем случае систему, которая в соответствии с современной терминологией полиферментных систем ([17], с. 192) может быть названа замкнутой дивергентно-конвергентной системой:



В этом случае выражение для лаг-периода реакции (2) преобразуется следующим образом:

$$\tau = \frac{1}{k_4} \cdot \frac{v_1}{v_1 + v_5} + \frac{1}{k_3} \cdot \frac{v_5}{v_1 + v_5} \quad (14)$$

Схема реакции (13) описывает параллельные полиферментные реакции, так что оба пути ($v_1 + v_4$, нижний путь на схеме 13, и $v_5 + v_3$, верхний путь) фактически шунтируют друг друга. Это в свою очередь приводит к существенным отличиям кинетических закономерностей по сравнению с последовательными полиферментными реакциями. Так, в последовательных (линейных) цепях период индукции образования конечного продукта

реакции определяется наиболее медленной стадией превращения субстрата (см. [17]). Напротив, в параллельных полиферментных цепях период индукции определяется наиболее быстрой стадией. Подобная закономерность обусловлена тем, что последовательное уменьшение скорости какой-либо стадии линейной цепи приводит к соответствующему замедлению и в итоге к прекращению всего процесса (из-за того, что данная стадия начинает лимитировать превращение исходного субстрата в конечный продукт), в то время как аналогичное уменьшение скорости какой-либо стадии параллельной системы после определенного предела перестает влиять на скорость всего процесса и поток вещества «переключается» на шунтирующий путь. Например, при дефиците целлобиазы в целлюлазных комплексах образование глюкозы из целлюлозы практически полностью идет по нижнему пути на схеме 13, и лаг-период по глюкозе определяется величиной V_4/K_4 (хотя формальное рассмотрение выражения 14 при малых k_3 свидетельствует, что первым слагаемым здесь можно пренебречь). При последовательном увеличении целлобиазной активности вклад верхнего пути на схеме 13 возрастает вплоть до практически полного переключения процесса образования глюкозы на этот путь (рис. 3), и лаг-период по глюкозе определяется в основном величиной V_3/K_3 (см. схему 9). Иначе говоря, понятие скоростylimитирующей стадии применительно к параллельным полиферментным системам следует употреблять с осторожностью (равно как и проводить оценки лаг-периодов образования конечных продуктов с помощью формального применения соответствующих формул, см., например, 14).

Рассмотрим в качестве примера кинетику образования глюкозы из хлопкового линта под действием целлюлазного препарата из *Asp. niger* фирмы «Serva» (содержащего самое высокое среди изученных здесь комплексов количество целлобиазы и пренебрежимо малое количество экзоглюкозидазы, см. табл. 1). На основании изложенных выше предположений о механизме ферментативного гидролиза можно полагать, что реакция под действием данного препарата протекает по верхнему пути схемы (13), т. е. согласно схеме (9). Полагая отсюда, что величина лаг-периода образования глюкозы определяется действием целлобиазы ($\tau \approx K_3/V_3$) и используя значения соответствующих констант в табл. 2, можно рассчитать, что величина τ в этом случае должна составлять 1,25 мин (для концентрации ферментного препарата 1 г/л). Соответствующая величина τ , найденная на опыте, составила $3,0 \pm 0,5$ мин [20], что достаточно удовлетворительно соответствует теории. Далее, если время выхода целлобиазы на стационарный режим также контролируется действием целлобиазы, то из уравнения (15)

$$[G_2] = \frac{V_5 [S]_0}{K_5 + [S]_0} \cdot \frac{1}{k_3} (1 - e^{-k_3 t}), \quad (15)$$

полученного при кинетическом анализе схемы (13), можно найти, что это время составит 1,5 или 2 мин (с точностью до 14 и 5% соответственно). Это же время, измеренное в прямом эксперименте, составило 3 мин, что также удовлетворительно совпадает с теорией.

Переключение основного процесса образования глюкозы с нижнего пути (схема 13) на верхний при обогащении целлюлазной системы целлобиазой наглядно иллюстрируется на примере гидролиза нерастворимой (микрористаллической) целлюлозы под действием препарата Rapidase. Поскольку данный препарат характеризуется существенным дефицитом целлобиазы (табл. 1), образующаяся целлобиоза непрерывно накапливается в ходе реакции, далее не гидролизуясь, в то время как практически вся глюкоза образуется под действием экзоглюкозидазы, по нижнему пути на схеме (13). Это приводит к характерным кинетическим кривым образования продуктов реакции (рис. 4a), где лаг-период по глюкозе достаточно

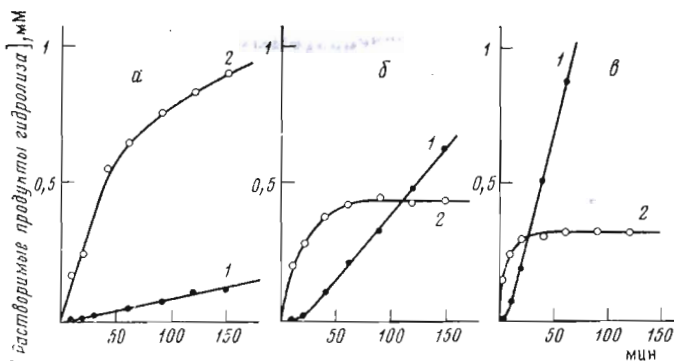


Рис. 4. Влияние количества добавляемой целлюлозы (из *Asp. foetidus*) на характер кинетических кривых образования глюкозы (1) и целлюлозы (2) в реакциях гидролиза микрокристаллической целлюлозы (30 г/л) под действием целлюлазного препарата Rapidase (0,25 г/л). а — целлюлоза не добавлялась; концентрация добавленной целлюлозы 0,003 (б) и 0,015 г/л (в)

мал (и определяется отношением V_4/K_4 , см. выше). При добавлении в реакционную систему целлюлозы (из другого источника, *Asp. foetidus*) наблюдается установление стационарного (или псевдостационарного) уровня промежуточной целлюлозы, хотя время установления данного режима еще существенно превышает лаг-период по глюкозе (рис. 4б). Эта картина характерна для действия так называемых «сбалансированных» целлюлазных комплексов (см. табл. 1 и рис. 1), где лаг-период по глюкозе определяется отношением V_4/K_4 , а время установления стационарной концентрации целлюлозы — отношением V_3/K_3 (в реальных системах последнее положение выполняется лишь приблизительно, поскольку на кинетику образования целлюлозы влияет конверсия исходного субстрата, а также адсорбция целлюлозы на целлюлозе, см. выше). Наконец, при добавлении избытка целлюлозы время выхода промежуточной целлюлозы на стационарный уровень уменьшается настолько, что становится близким к величине лаг-периода образования глюкозы (рис. 4в), которое также начинает уменьшаться пропорционально количеству добавленной целлюлозы. Здесь, как следует из изложенного выше, основная часть глюкозы уже образуется под действием добавленной целлюлозы, по верхнему пути ла схеме (13). При этом стационарная скорость образования глюкозы в присутствии избытка целлюлозы (рис. 4в) в 20 раз превышает стационарную скорость ее образования под действием исходного ферментного препарата (рис. 4а). Стационарный уровень промежуточной целлюлозы здесь достаточно мал, а в ряде случаев вообще не детектируется (как было показано нами ранее для гидролиза микрокристаллической целлюлозы под действием целлюлазного препарата из *Asp. foetidus* [16], а также для гидролиза хлопкового линта препаратами из *T. reesei* и *G. candidum* в присутствии добавляемой целлюлозы из *Asp. foetidus* [7]).

Приведенные здесь экспериментальные зависимости скоростей и концентраций, характеризующие действие целлюлазных препаратов из различных источников, не противоречат общей схеме ферментативного гидролиза целлюлозы (1) и (или) ее частного случая (13). Поскольку целлюлазные препараты, изученные в данной работе, были выбраны достаточно произвольно, можно полагать, что схемы (1)–(13) отражают распространенный и, видимо, единый механизм ферментативного гидролиза целлюлозы (схема 13 применима, во всяком случае, к начальным этапам превращения целлюлозы) под действием целлюлазных препаратов различного происхождения. Более того, как показано в настоящей статье, направленное варьирование состава различных целлюлазных комплексов

приводит к определенным и предсказуемым кинетическим проявлениям полиферментной целлюлазной системы. Эти выводы свидетельствуют о принципиальной возможности получения целлюлазных комплексов с заранее заданными свойствами в отношении гидролиза нерастворимой (в том числе нативной) целлюлозы.

Экспериментальная часть

В работе использованы 10 целлюлазных препаратов из различных источников или различной степени очистки (табл. 1), характеристики которых даны в предыдущей работе данной серии [6]. Там же дано подробное описание используемых материалов и методов определения активностей индивидуальных компонентов целлюлазного комплекса [6].

В качестве водонерастворимого субстрата для изучения кинетики действия целлюлазных препаратов в большинстве опытов использовали измельченный хлопковый линт (ГОСТ 3848.0-72, 4-й сорт, III тип), полученный в ЦНИИХпром, Ташкент. Характеристики хлопкового линта и методика его измельчения на вибромельнице приведены в предыдущих работах [5, 26]. В некоторых экспериментах (указано в тексте) в качестве нерастворимого субстрата использовали микрокристаллическую целлюлозу (Chemapol, СССР).

Изучение кинетики ферментативного гидролиза нерастворимой целлюлозы проводили при 40° С и pH 4,5 (0,05 М ацетатный буфер, 0,1 М NaCl) при перемешивании. Методика регистрации кинетики подробно описана в работе [20]. Определение глюкозы проводили глюкозооксидазно-пероксидазным методом, определение восстанавливающих сахаров — модифицированным методом Шомоди — Нельсона [6]. Качественный анализ продуктов гидролиза хлопкового линта и микрокристаллической целлюлозы под действием всех изученных целлюлазных препаратов с помощью входящей хроматографии на бумаге (элюент — смесь *n*-пропанол — этилацетат — вода, 7 : 1 : 2) показал, что растворимыми продуктами гидролиза во всех случаях являются только глюкоза и целлобиоза. Отсюда концентрацию образующейся в ходе ферментативной реакции промежуточной целлобиозы рассчитывали как разность соответствующих концентраций восстанавливающих сахаров и глюкозы.

Изучение кинетики гидролиза хлопкового линта под действием целлюлазных комплексов из различных источников проводили также в присутствии добавленной очищенной целлобиазы. Типичный эксперимент проводили следующим образом. К суспензии измельченного линта в буферном растворе (pH 4,5; 40° С) добавляли исходный целлюлазный препарат и систему перемешивали. Через 30 с вносили определенный объем раствора целлобиазы и еще через 15 с отбирали первую пробу. Последующие пробы отбирали с интервалами 1—30 мин и определяли количественное содержание продуктов реакции (глюкозы и восстанавливающих сахаров). Специальными экспериментами было показано, что добавление электрофоретически гомогенного препарата целлобиазы из *T. koningii* [25] в реакционную систему приводит к таким же кинетическим эффектам, как и при добавлении целлобиазы из *Asp. foetidus*.

Авторы выражают благодарность И. В. Чуриловой за проведение кинетических экспериментов по ферментативному гидролизу микрокристаллической целлюлозы, А. П. Сеницыну за проведение хроматографического анализа продуктов ферментативного гидролиза нерастворимой целлюлозы и М. Л. Рабиновичу за плодотворное обсуждение результатов данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клесов А. А., Рабинович М. Л., Чурилова И. В., Синицын А. П., Григораш С. Ю., Тихонова Т. В., Малиновская Л. М. Ферментативный гидролиз целлюлозы. II. Свойства компонентов целлюлазных комплексов из различных источников.— Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1377—1395.
2. Клесов А. А., Рабинович М. Л. Ферментативный гидролиз целлюлозы.— В сб.: Инженерная энзимология и биоорганический катализ / Ред. Кретович В. Л., Березин И. В. Итоги науки и техники, сер. Биологическая химия. М.: ВИНТИ, 1978, т. 12, с. 49—91.
3. Coughlan M. P., Folan M. A. Cellulose and cellulases: food for thought, food for the future? — *Int. J. Biochem.*, 1979, v. 10, p. 103—108.
4. Klyosov A. A., Rabinowitch M. L. Enzymatic conversion of cellulose to glucose: present state of the art and potential.— In: *Enzyme Engineering — Future Directions* / Eds Wingard L. B., Berczin I. V., Klyosov A. A. New York — London: Plenum Press, 1980, p. 83—165.
5. Клесов А. А., Григораш С. Ю. Взаимосвязь между кинетикой гидролиза растворимой и нерастворимой (природной) целлюлозы под действием полиферментных целлюлазных комплексов.— Биохимия, 1980, т. 45, вып. 2, с. 228—241.
6. Клесов А. А., Рабинович М. Л., Синицын А. П., Чурилова И. В., Григораш С. Ю. Ферментативный гидролиз целлюлозы. I. Активность и компонентный состав целлюлазных комплексов из различных источников.— Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1225—1242.
7. Рабинович М. Л., Клесов А. А., Березин И. В. Механизм образования глюкозы при ферментативном гидролизе производных целлюлозы: сравнительная роль экзо-1,4- β -глюкозидазы и целлобиазы.— Докл. АН СССР, 1979, т. 246, № 2, с. 500—504.
8. Григораш С. Ю., Клесов А. А. Влияние состава полиферментных целлюлазных комплексов на характер стадий, лимитирующих скорость гидролиза переставляемой (природной) целлюлозы.— Биохимия, 1981, т. 46, № 1, с. 110—119.
9. Klyosov A. A., Sinitsyn A. P., Rabinowitch M. L. The comparative role of exoglucosidase and cellobiase in glucose formation from cellulose.— In: *Enzyme Engineering* / Eds Weetall H. H., Royer G. P. New York — London: Plenum Press, 1980, p. 153—165.
10. Rabinowitch M. L., Klyosov A. A. Comparative role of components of cellulase complex.— II International Symposium on Bioconversion and Biochemical Engineering, Delhi, 1980, Abstracts, p. 24—28.
11. Синицын А. П., Клесов А. А. Сравнительная роль экзо-1,4- β -глюкозидазы и целлобиазы при ферментативном гидролизе целлюлозы.— Биохимия, 1981, т. 46, № 2, с. 202—213.
12. Чурилова И. В., Максимов В. И., Клесов А. А. Целлобиоза — регулятор активности эндоглюканаза целлюлазных комплексов. Механизм регуляции.— Биохимия, 1979, т. 44, вып. 11, с. 2100—2102.
13. Ryu D. D. Y., Mandels M. Cellulases: biosynthesis and applications.— *Enzyme Microb. Technol.*, 1980, v. 2, № 4, p. 91—102.
14. Rabinowitch M. L., Klyosov A. A. Role of adsorption of cellulases on cellulose.— II International Symposium on Bioconversion and Biochemical Engineering, Delhi, 1980, Abstracts, p. 53—56.
15. Клесов А. А., Рабинович М. Л. Современные представления о механизме ферментативного гидролиза целлюлозы.— В сб.: Превращение древесины при микробиологическом и энзиматическом воздействиях / Ред. Громов В. С. Рига: Зинатне, 1980, с. 8—15.
16. Клесов А. А., Чурилова И. В. Гидролиз микрокристаллической целлюлозы под действием полиферментных целлюлазных комплексов различного происхождения.— Биохимия, 1980, т. 45, вып. 9, с. 1685—1695.
17. Березин И. В., Варфоломеев С. Д. Биокинетика. М.: Наука, 1979, с. 201—216.
18. Easterby J. S. Coupled enzyme assays. General expression for the transient.— *Biochim. et biophys. acta*, 1973, v. 293, № 2, p. 552—558.
19. McClure W. R. Kinetic analysis of coupled enzyme assays.— *Biochemistry*, 1969, v. 8, № 7, p. 2782—2786.
20. Клесов А. А., Григораш С. Ю. Кинетика действия полиферментных целлюлазных комплексов на нерастворимые производные целлюлозы.— В сб.: Полиферментные системы / Ред. Клесов А. А. Вильнюс: ВНИИПЭ, 1980, ч. 1, с. 81—108.
21. Vaheri M., Leisola M., Kauppinen V. Enzymatic degradation products from cellulose.— 1st Eur. Congr. Biotechnol., Interlaken, 1978, Prepr., Part 2, Frankfurt / M., 1978, p. 3/6.
22. Ladisch M. R., Anderson A. A., Tsao G. T. Measurement of cellulolytic activity by low pressure liquid chromatography.— Proceedings of the 4th Joint US/USSR Enzyme Engineering Conference, New Orleans, Louisiana, 1978, p. 182—203.
23. Shoemaker S. P., Brown R. D. Enzymic activities of endo-1,4- β -D-glucanases purified from *Trichoderma viride*.— *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 523, p. 133—146.
24. Storer G. B., Gawthorne J. M., Francis G. L., Illman R. J. The determination of cellulase activity by gas-liquid chromatography.— *Anal. Biochem.*, 1979, v. 92, p. 270—275.

25. Чурилова И. В., Максимов В. И., Клесов А. А. Очистка и свойства низкомолекулярной эндоглюканазы целлюлазного комплекса из *Trichoderma koningii*.— Биохимия, 1980, т. 45, в. 4, с. 669–678.
26. Саницын А. П., Клесов А. А., Агафонов М. Н., Хасанов Х. Х., Рахимов М. М. Получение глюкозы из целлюлозосодержащих материалов с помощью препаратов целлюлаз различного происхождения.— Прикл. биохим. и микробиол., 1980, вып. 1, с. 29–39.

Поступила в редакцию
28.I.1981

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CELLULOSE. III. REGULARITIES OF THE
GLUCOSE AND CELLOBIOSE FORMATION UNDER THE ACTION OF MULTIENZYME
CELLULASE SYSTEMS ON INSOLUBLE (NATIVE) CELLULOSE

KLYOSOV A. A., GRIGORASH S. Yu.

Chemistry Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow

The main routes for glucose and cellobiose formation in the course of enzymatic transformation of insoluble cellulose have been elucidated. The kinetic regularities of the hydrolysis were studied either in steady-state or non-steady-state conditions using 10 multienzyme cellulase complexes from *Trichoderma*, *Geotrichum*, and *Aspergillus* fungi, or the Rapidase preparation. At low conversion degree of cellulose the intermediate cellobiose was shown to result directly from the starting substrate, rather than from a random cleavage of intermediate oligosaccharides. It was experimentally proved that the formation of glucose from cellulose proceeded by the two parallel routes (under the action of both exoglucosidase and cellobiase) which form in general a cyclic multienzyme system. The data provided unequivocal evidence for the common mechanism of the cellulose hydrolysis by cellulase complexes, whatever their source or composition.