



УДК 577.154.33

ЗАМЕЩЕННЫЙ ЦЕЛЛОДЕКСТРИН — НОВЫЙ СУБСТРАТ ДЛЯ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКЗОГЛЮКОЗИДАЗЫ В ЦЕЛЛЮЛАЗНЫХ КОМПЛЕКСАХ

Рабинович М. Л., Мартыянов В. А., Чулик Г. А.

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

Блесов А. А.

Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва

Для избирательного определения экзоглюкозидазной активности в целлюлазных комплексах предложен новый субстрат — СМ-замещенные целлодекстрины. Они получены путем гидролиза СМ-целлюлозы эндоглюканазой (препаратами целлюлаз) в присутствии целлюбиазы. С помощью целлюлазного препарата *Geotrichum candidum* в присутствии целлюбиазы получен целлодекстрин со степенью полимеризации 20–21 и степенью замещения 0,79, в молекуле которого незамещенные глюкозные остатки не встречаются более чем три подряд. Декстрин имеет на концах незамещенные глюкозные остатки, которые могут отщепляться экзоглюкозидазой целлюлазного препарата *Trichoderma reesei*, тогда как эндоглюканаза, целлюбогидролаза и целлюбиаза не действуют на этот декстрин. Показана возможность использования полученных декстринов для определения экзоглюкозидазы в целлюлазных комплексах.

При исследовании ферментов, расщепляющих углеводы, трудной задачей является определение экзогликаназ в присутствии эндогликаназ и гликозидаз. Известны два типа экзогликаназ [1]: экзогликаназы, отщепляющие от конца полимерного субстрата моносахарид (глюкоамилаза, экзо-1,4-β-глюкогидролаза и т. п.), и ферменты, отщепляющие дисахарид (β-амилаза, экзоцеллюбогидролаза и т. п.). Определению экзогликаназ первого типа мешает образование моносахарида в результате действия других ферментов, в первую очередь гликозидаз. Попытки раздельного определения этих ферментов основаны главным образом на их противоположной специфичности по отношению к длине олигосахаридного субстрата, а также на неодинаковой чувствительности к лактонам — селективным ингибиторам гликозидаз [2–4]. Определению экзогликаназ второго типа мешают в основном эндоферменты, способные образовывать одинаковый с ними продукт — дисахарид. Сказанное относится не только к использованию субстратов с низкой степенью полимеризации (от 3 до 6–7), но и к полисахаридам. В последнем случае имеется и еще один усложняющий момент: пока концентрация молекул полимера ниже константы Михаэлиса экзогликаназы, определяемая активность последней зависит от активности эндогликаназы, поставляющей новые молекулы субстрата для действия экзофермента [5].

Указанные причины вызывают необходимость подбора такого субстрата для экзоферментов, на который бы в минимальной степени действовали эндогликаназы и гликозидазы. Таким субстратом, по-видимому, может служить предельный декстрин, получаемый путем исчерпывающего гидролиза замещенного или разветвленного гомоолисахарида эндогликаназой. Например, продукт исчерпывающего гидролиза амилопектина или гликогена α-амилазой [6] или замещенный целлодекстрин, полученный нами при продолжительном гидролизе растворимой СМ-целлюлозы эндоглюканазой в присутствии избытка β-глюкозидазы. Такие декстрины могут иметь на невозстанавливаемом конце один или несколько незамещенных моносахаридных остатков, которые вследствие достаточно высокой степени полимеризации субстрата могут отщепляться экзофер-

ментами, по не гликозидазами. Эндогликазаны также не расщепляют таковой декстрины, поскольку он является конечным продуктом действия этих ферментов на целлюлозу. Следовательно, названные декстрины могут служить субстратами для селективного определения экзоферментов в целлюлазных комплексах, которые в общем случае содержат эндоглюканазу, экзоглюкапазы обоих типов и β -глюкозидазу (целлобиазу) [5].

Настоящая работа посвящена получению замещенных целлодекстринов и их изучению как субстратов для избирательного определения экзоглюкозидаз в целлюлазных комплексах.

Гидролиз СМ-целлюлозы начинается с действия эндоглюканазы на участках полиацетилгидроглюкозной цепи, не содержащих карбоксиметильных групп [7, 8]. При произвольном распределении заместителей в цепи полимера длина этих участков может быть какой угодно большой, однако с увеличением их длины, а также степени замещения полимера число таких участков уменьшается. Скорость же гидролиза эндоглюканазой, напротив, возрастает с увеличением длины незамещенного участка. Минимальным участком, подвергающимся действию эндоглюканазы, является участок из двух незамещенных глюкозных остатков [7], однако скорость расщепления таких участков крайне незначительна, и большинство эндоглюканаз с заметной скоростью расщепляют лишь участки из трех и более [8], а по нашим данным [5] — из 4 и более незамещенных остатков глюкозы. Именно при расщеплении таких участков и можно ожидать образования замещенных целлодекстринов различной длины, имеющих на концах по одному или несколько незамещенных глюкозных звеньев.

В состав продуктов гидролиза СМ-целлюлозы входят также глюкоза и целлобиоза, образуемые экзоферментами, и небольшие количества целлоолигосахаридов более высокой степени полимеризации, образующихся при неоднократном действии эндоглюкапазы на один и тот же достаточно продолжительный незамещенный участок. Соотношение различных продуктов зависит от относительной активности компонентов целлюлазного комплекса и изменяется в ходе гидролиза. Полный гидролиз замещенных целлодекстринов не наблюдается даже при очень длительной инкубации из-за наличия заместителей в цепи полимера [9].

Ранее нами было установлено [5], что для большинства целлюлазных комплексов (за исключением тех, в которых нет экзоферментов и преобладает β -глюкозидаза) накопление замещенных целлодекстринов под действием эндоглюканазы заканчивается раньше, чем накопление глюкозы, и в дальнейшем, очевидно, происходит только их последовательное укорачивание без изменения молярной концентрации, т.е. гидролиз по экзомеханизму. Это говорило о возможности выделить на промежуточной стадии гидролиза замещенные целлодекстрины, которые не подвергались бы дальнейшему действию эндоглюканазы, но оставались субстратом для экзоферментов. Для получения этих целлодекстринов были выбраны несколько целлюлазных препаратов, в которых, по полученным нами ранее данным [10], активность экзоглюкозидазы была невелика или почти отсутствовала (таблица).

Характеристика ферментных препаратов, использованных в работе
Приведены ед. акт. на 1 г препарата

Источник получения	Эндоглюка-наза	Целлобиаза	Экзоглюко-гидролаза
<i>Geotrichum candidum</i> *	750	250	40
<i>Aspergillus foetidus</i> *	230	1350	1
<i>Trichoderma reesei</i> (Novo, Дания)	900	10	400
Rapidase (Rapidase, Франция)	450	1	5

* Препараты очищены методом гель-фильтрации в лаборатории по получению ферментов для медицинских целей ВНИИбиотехника и любезно предоставлены канд. хим. н. В. И. Максимовым.

Гидролиз СМ-целлюлазы проводили в условиях избытка целлобиазы гриба *Aspergillus foetidus* над эндоглюканазой. Дополнительное введение целлобиазы преследовало две цели. Во-первых, таким образом из целлодекстринов удалялись остатки глюкозы, способные отщепляться под действием этого фермента, чтобы в дальнейшем они не мешали определенной экзоглюкогидролазы. Во-вторых, избыток целлобиазы позволял сразу переводить в глюкозу целлобиозу и низшие незамещенные целлоолигосахариды, образуемые в процессе действия эндоглюканазы, и предотвращать их накопление в сколько-нибудь заметных количествах. При этом существенно упрощается интерпретация экспериментальных данных и облегчается операция выделения замещенных целлодекстринов, поскольку единственным сопутствующим им продуктом является глюкоза, легко отделяющаяся при фракционировании этанолом.

Образование глюкозы и восстанавливающих сахаров при гидролизе СМ-целлюлозы целлюлазным комплексом *Geotrichum candidum* в присутствии избытка целлобиазы практически заканчивается через 2–3 ч (рис. 1). Глюкоза составляет $\sim 2/3$ общей концентрации восстанавливающих сахаров, оставшаяся треть приходится на замещенные целлодекстрины, не подвергающиеся дальнейшему действию эндоглюканазы. Поскольку в условиях избытка целлобиазы все промежуточные продукты гидролиза сразу превращаются в глюкозу, кривая 3, представляющая собой разность между общей концентрацией восстанавливающих сахаров и концентрацией глюкозы, характеризует только образование замещенных целлодекстринов при действии эндоглюканазы на незамещенные участки СМ-целлюлозы.

Из данных рис. 1 нетрудно вычислить степень гидролиза СМ-целлюлозы, которая в этих условиях составляет 14%. В виде глюкозы выделяется 21% общего количества незамещенных глюкозных остатков, содержащихся в полимере. Отсюда можно рассчитать, что в целлодекстринах доля незамещенных остатков снижается с 45 до 39%, а степень замещения возрастает с 0,7 до 0,79 (см. данные работы [7]). Как показывает несложный расчет, среднечисловая степень полимеризации замещенных целлодекстринов составляет 20–21.

По данным рис. 1 может быть вычислена минимальная длина незамещенного участка, подвергающегося действию эндоглюканазы [5]:

$$l = \frac{\lg([P]_{\infty} - M_1/C)}{\lg(1 - S)},$$

где l — минимальная длина незамещенного участка, подвергающегося расщеплению, $[P]_{\infty}$ — предельная концентрация замещенных целлодекстринов, равная в данном случае 2,8 мМ, M_1 — средняя молекулярная масса мономерного звена СМ-целлюлозы, зависящая от степени замещения и равная 218, C — весовая концентрация исходного полимера (14 г/л), S — доля замещенных остатков в молекуле полимера, зависимость которой от степени замещения приведена в работе [7] (в нашем случае $S = 0,55$). С помощью приведенной формулы легко показать, что минимальная длина расщепляемого незамещенного участка в данном случае равна 4, что согласуется с результатами, полученными нами ранее [5].

Чтобы выяснить, содержат ли полученные целлодекстрины незамещенные остатки глюкозы на концах, оценим общее содержание этих остатков во всех расщепленных участках с длиной ≥ 4 (Q). В общем виде его можно выразить суммой

$$Q = \frac{C}{M_1} \sum_i (1 - S)^i S,$$

где $(1 - S)^i S$ — мольная доля участков из i незамещенных звеньев. Легко показать, что эта сумма эквивалентна сумме двух убывающих геометрических прогрессий:

$$Q = \frac{C}{M_1} \left[(l-1) \sum_i (1-S)^i S + \sum_i (1-S)^i \right],$$

которая равна $\frac{C}{M_1} \left(l-1 + \frac{1}{S} \right) (1-S)^l$, т. е. она в $\left(l-1 + \frac{1}{S} \right)$ раз больше

общей концентрации расщепленных участков, которая в свою очередь равна концентрации образующихся замещенных целлодекстринов (2,8 мМ). Отсюда следует, что общая концентрация незамещенных остатков в расщепленных участках составляет 13,5 мМ. В действительности же при расщеплении этих участков выделяется только 6 ммоль глюкозы/л (рис. 1). Оставшиеся 7,5 ммоль/л незамещенных остатков, очевидно, расположены на концах целлодекстринов — примерно по три моля на 1 моль целлодекстрина. Это можно представить таким образом, что при расщеплении участка из четырех незамещенных остатков в дальнейшем освобождается только один остаток глюкозы, расщепление участка из пяти остатков приводит к выделению двух остатков глюкозы и т. д.

Итак, полученные декстрины характеризуются следующими параметрами: среднечисловая степень полимеризации 20–21, степень замещения 0,79, содержание незамещенных остатков 39%, причем они чередуются с замещенными, не встречаясь более чем по три подряд. На обоих концах молекулы декстрина в сумме имеется три незамещенных остатка.

После выделения целлодекстринов из реакционной смеси (см. «Экспериментальную часть») было изучено действие целлюлазных препаратов, приведенных в таблице, на раствор декстринов с концентрацией 2,3 мМ (11 г/л). Препарат *Asp. joetidus* не действовал на раствор целлодекстринов даже при активности β -глюкозидазы 1 ед. акт./мл. Препарат Rapidase также не действовал на целлодекстрины при концентрации эндоглюканазы 1 ед. акт./мл. Совместное действие этих препаратов также не приводило к заметному гидролизу целлодекстринов.

Иначе обстоит дело с препаратом гриба *Trichoderma reesei*. Этот препарат, обладающий высокой экзоглюкозидазной активностью, гидролизует целлодекстрины, причем единственным продуктом гидролиза была глюкоза (рис. 2). Следовательно, замещенные декстрины подвергаются только гидролизу по экзомеханизму. Так как целлюлаза практически не действует на полученные декстрины, образование глюкозы происходит только под действием экзоглюкозидазы. Действие эндоглюканазы по механизму гидролиза через трансгликозилирование, которое в принципе также может приводить к образованию глюкозы [11], очевидно, можно исключить. Об этом свидетельствует параллельное нарастание глюкозы и восстанавливающих сахаров, в то время как при механизме гидролиза через трансгликозилирование общая концентрация восстанавливающих сахаров не должна была бы изменяться, так как выделение глюкозы сопровождается конденсацией молекул декстрина.

Добавление избытка целлюлазы к препарату *T. reesei* не вызывает дополнительного образования глюкозы и восстанавливающих сахаров (рис. 2), которое наблюдалось бы, если бы в ходе реакции помимо глюкозы образовывалась также целлюлоза под действием экзоцеллюлозгидролазы данного препарата [12]. Таким образом, выделенные целлодекстрины являются субстратом только экзоглюкозидазы и не расщепляются остальными компонентами целлюлазного комплекса.

Лишнее образование глюкозы во времени характерно только для первых 30 мин реакции, а затем происходит быстрое истощение субстрата (рис. 2). Всего из 2,3 ммоль целлодекстринов освобождается лишь 0,4 ммоль глюкозы. Это показывает, что полученные декстрины не являются однородными и не каждый из них представляет собой субстрат экзоглюкозидазы. Можно полагать, что молекула декстрина содержит не более одного остатка глюкозы, отщепляемого экзоферментом (об этом свидетельствует отсутствие действия экзоцеллюлозгидролазы, для которой необходимо наличие не менее двух таких остатков). Следовательно, лишь $\sim 1/6$ молекул декстринов представляют собой субстраты экзоглюкогидро-

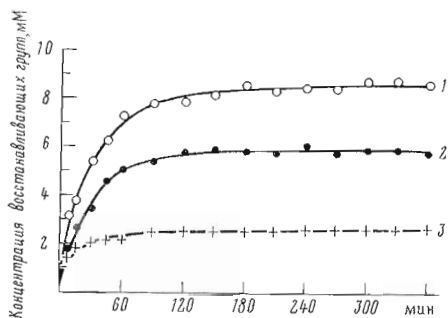


Рис. 1

Рис. 1. Кинетика ферментативного гидролиза СМ-целлюлозы (14 г/л) эндоглюканазой *G. candidum* (0,25 ед. акт./мл) в присутствии избытка целлюбиазы *Asp. foetidus* (0,6 ед. акт./мл): 1 — образование общих восстанавливающих сахаров, 2 — образование глюкозы, 3 — образование замещенных целлодекстринов (40° С, рН 4,5)

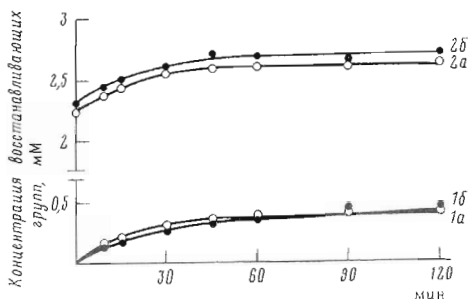


Рис. 2

Рис. 2. Гидролиз замещенных целлодекстринов (11 г/л) целлюлазным комплексом *T. reesei* (0,2 г/л): а — в отсутствие, б — в присутствии избытка целлюбиазы препарата *Asp. foetidus* (0,2 г/л). 1 — образование глюкозы, 2 — образование восстанавливающих сахаров (40° С, рН 4,5)

лазы, несмотря на то что все они содержат в среднем три незамещенных остатка на обоих концах.

Такой вывод в общем не является неожиданным. Действию экзоферментов подвержены только остатки, расположенные на невосстанавливаемом конце. Однако более вероятным представляется их расположение именно на восстанавливаемом конце, недоступном действию экзоферментов. Это зависит в основном от специфичности эндоглюканазы к положению расщепляемой связи в незамещенных участках СМ-целлюлозы в ходе получения целлодекстринов. Существующие модели активного центра эндоглюканаз предполагают, что каталитический центр гидролиза гликозидной связи делит сорбционную площадку на две неравные части: большую гликоновую, связывание с которой вносит основной вклад в фермент-субстратное взаимодействие, и меньшую агликоновую [13]. Это приводит к выводу, что расщепление участков из 4—5 незамещенных остатков, размер которых не превышает длину активного центра эндоглюканазы, происходит так, что у получающихся декстринов незамещенные остатки остаются на восстанавливаемом конце, образуясь на гликоновой части. Поэтому при гидролизе коротких незамещенных участков образуются декстрины, не являющиеся субстратом экзоферментов. Однако гидролиз незамещенных участков, более длинных, чем активный центр эндоглюканазы, может происходить различными способами, в том числе и такими, при которых образующийся целлодекстрин содержит незамещенные остатки на невосстанавливаемом конце. К аналогичному выводу привели нас и предыдущие исследования [5], где было показано, что образование субстрата экзоферментов заканчивается уже при гидролизе участков из пяти и более незамещенных остатков, а последующий гидролиз незамещенных участков из четырех остатков не вызывает дополнительного образования такого субстрата.

Итак, полученный субстрат позволяет наглядно продемонстрировать экзоглюкозидазную активность целлюлазного комплекса и в отсутствие других активностей. Это важный аргумент в пользу существования особого фермента — экзоглюкозидазы, которое признано пока немногими исследователями, работающими в данной области. Однако большая часть полученного декстрина представляет собой неактивный «балласт». По этой причине, а также потому, что этот декстрин не является специфическим субстратом экзоглюкозидазы, скорость его гидролиза экзоглюкозидазой *T. reesei* в 6—7 раз меньше скорости образования глюкозы этим ферментом при гидролизе СМ-целлюлозы той же весовой концентрации [14]. По всей вероятности, в ходе гидролиза СМ-целлюлозы экзоглюко-

зидаза активно действует на субстраты других ферментов (например, целлобиогидролазы), отсутствующие в выделенном декстрине.

Относительно низкая скорость энзиматического гидролиза полученного субстрата затрудняет его использование для экспрессного определения экзогликозидазной активности. Поэтому нами были изучены способы получения более быстро расщепляемых замещенных декстринов с помощью других целлюлазных препаратов — источников эндоглюканазы для первичного гидролиза СМ-целлюлозы. Использованный нами препарат *G. candidum* не является оптимальным во многих отношениях. Во-первых, в нем имеется собственная экзогликозидаза (хотя и в небольших количествах, см. таблицу), которая гидролизует часть субстрата уже в ходе его получения. Во-вторых, экзоцеллобиогидролаза данного ферментного препарата, очевидно, отщепляет от целлодекстринов дисахарид, снижая общее количество пезамещенных остатков глюкозы на их невосстанавливающих концах и тем самым конкурируя с экзогликозидазой. Наконец, можно ожидать, что эндоглюканазы препаратов чаще образуют незамещенные остатки именно на невосстанавливающем конце, чем ферменты *G. candidum*.

Наиболее перспективным для получения целлодекстринов нам представляется препарат *Asp. foetidus*. В нем имеется избыток целлобиазы по сравнению с эндоглюканазой, отсутствует экзогликозидазная активность (таблица) и, по-видимому, нет целлобиогидролазы [10]. Для получения целлодекстринов может быть использован препарат (не только очищенный, но и технический) этого гриба — пектофоеидин П10х, выпускаемый отечественной промышленностью и имеющий 80—100 ед. акт./г эндоглюканазы и 300—400 ед. акт./г целлобиазы [10].

Исчерпывающий гидролиз СМ-целлюлозы препаратом *Asp. foetidus* проводили ступенчатым методом для снижения ингибирующего действия глюкозы (см. «Экспериментальную часть»). Таким способом были получены целлодекстрины, в 2 раза быстрее расщепляющиеся экзогликозидазой, чем декстрины, полученные с использованием препарата *G. candidum*. Следует отметить, что при действии препарата *T. reesei* в присутствии и в отсутствие целлобиазы на эти декстрины количество образуемых восстанавливающих сахаров не совпадало с количеством глюкозы, как при гидролизе декстринов, полученных с помощью препарата *G. candidum* (рис. 2), а превышало его в 2—3 раза. Это указывает на способность эндоглюканазы *T. reesei* к более глубокому гидролизу СМ-целлюлозы, чем эндоглюканазы *Asp. foetidus*, вследствие неодинаковой субстратной специфичности эндоглюканаз *T. reesei* и *Asp. foetidus* по отношению к минимальной длине незамещенного участка (последняя в этом отношении сходна с эндоглюканазой *Asp. niger*, практически заканчивающей действие на незамещенных пентасахаридных участках [5]). Тем не менее дополнительное действие эндоглюканазы *T. reesei* не влияет на определение экзогликозидазной активности, поскольку, как отмечалось выше, оно уже не приводит к образованию нового субстрата экзогликозидазы.

Замещенные целлодекстрины были получены также с использованием эндоглюканазы препарата фирмы «Rapidase» (см. таблицу) в присутствии избытка целлобиазы *Asp. foetidus*. Выделение декстринов проводили на различных стадиях действия эндоглюканазы. Наиболее активными и удобными для этой цели оказались декстрины, выделенные до полного завершения гидролиза. Скорость образования глюкозы под действием экзогликозидазы для таких декстринов лишь немного уступала скорости ее образования при гидролизе СМ-целлюлозы. С их помощью была показана экзогликозидазная активность в препаратах *T. reesei*, *T. viride*, *T. longibrachiatum*, *T. lignorum*, *T. koningii*, *G. candidum*, а также во фракциях целлюлазного комплекса *G. candidum*, не содержащих эндоглюканазы и целлобиазы, но обладающих так называемой С₁-активностью*. Кроме того, полученные таким образом целлодекстрины хорошо зарекомендовали себя при экспресс-определении экзогликозидазной активности, так как обра-

* Получены Н. А. Родионовой, ст. н. сотр. лаборатории ферментных препаратов Института биохимии им. А. Н. Баха.

зование глюкозы в этом случае протекает без индукционного периода, как при гидролизе СМ-целлюлозы [14], и не зависит от присутствия эндоглюканазы или целлобиазы. Индивидуальная целлобиаза не расщепляет эти декстрины, а эндоглюканаза, хотя и гидролизует их, но это уже не сказывается на определении экзоглюкозидазы. При действии целлюлазных комплексов на эти декстрины образуется также целлобиоза, что можно приписать действию эндоглюканазы или целлобигидролазы.

Подводя итог, можно отметить, что замещенные целлодекстрины — перспективный субстрат для определения активности экзоглюкозидаз, имеющий ряд несомненных достоинств перед низкомолекулярными целлоолигосахаридами и полимерными субстратами. Декстрины, полученные при частичном гидролизе СМ-целлюлозы, удобны для экспрессного определения активности экзоглюканазы. Отсутствие или недостаток эндоглюканазы в образце не являются здесь препятствием, как при определении экзоглюканазы с помощью СМ-целлюлозы. Не мешает и целлобиаза, поэтому нет необходимости применять ее селективные ингибиторы. Существует принципиальная возможность использовать такие декстрины и для совместного определения экзоглюканазы и экзоцеллобигидролазы в условиях, когда учитывается конкуренция ферментов за субстрат, имеющий два или более отщепляемых глюкозных остатка с невозстанавливающего конца.

Экспериментальная часть

В работе использована натриевая соль СМ-целлюлозы со степенью замещения 0,7 и степенью полимеризации 450 (отечественного производства). Характеристика целлюлазных препаратов приведена в таблице. Методы определения активности компонентов целлюлазного комплекса в международных единицах описаны в предыдущей работе [10]. Глюкозу определяли глюкозооксидазно-пероксидазным методом [10, 15], восстанавливающие сахара — методом Нельсона-Шомоди [10, 16].

Замещенные целлодекстрины получали путем инкубации 1,5%-ного раствора СМ-целлюлозы с препаратом эндоглюканазы (0,25—1 ед. акт./мл) в присутствии избытка целлобиазы *Asp. foetidus* (0,6—2,5 ед. акт./мл) при рН 4,5 в 0,1 М ацетатном буфере и 40° С. Степень гидролиза контролировали путем определения восстанавливающих сахаров и глюкозы в аликвотах, отбираемых через определенные интервалы времени. После прохождения реакции до нужной глубины реакционную смесь кипятили 30 мин для инактивации ферментов, отделяли фильтрованием хлопья денатурированного белка и выливали в охлажденный до -20° С ацетон или этанол. Осадок целлодекстринов формировали в течение 2 сут в холодильной камере, центрифугированием отделяли, промывали холодным этанолом и сушили в вакууме. Наилучшим образом сформированный осадок получен при выливании реакционной смеси в 4 объема абс. этанола. При этом достигается практически 100%-ная полнота осаждения целлодекстринов. Высушенные целлодекстрины, выход которых составляет 90—95% от теоретического, имеют различную гигроскопичность в зависимости от глубины гидролиза СМ-целлюлозы. Чем меньше глубина гидролиза, тем менее гигроскопичен осадок и тем быстрее он формируется. Замещенные целлодекстрины хорошо растворимы в буфере с рН 4,5, вплоть до концентрации 100 мг/мл (значительно лучше, чем исходная СМ-целлюлоза). Концентрированный раствор целлодекстринов имеет слабую опалесценцию. Примеси глюкозы и целлобиозы в полученных целлодекстринах незначительны и после переосаждения из этанола не определяются.

Для определения исчерпывающего гидролиза СМ-целлюлозы препаратом *Asp. foetidus* реакцию осуществляли в две стадии. Сначала проводили гидролиз в течение 1 сут. Затем реакционную смесь выливали в 4 объема охлажденного этанола, выдерживали 6 ч при 5° С, осадок отфильтровывали и растворяли в буферном растворе с рН 4,5, объем которого был в 3 раза меньше объема исходной реакционной смеси. При этом концентри-

ровался субстрат и отделялась накопившаяся глюкоза, ингибирующая целлюлазу *Asp. foetidus*. В то же время осаждение этанолом не приводило к заметной инактивации эндоглюканазы и целлюлазы, которые осаждались вместе с целлодекстринами. После повторного растворения инкубацию вели еще 2 сут, а затем проводили инактивацию ферментов и выделение целлодекстринов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Номенклатура ферментов. Рекомендации международного биохимического союза / Ред. Браунштейн А. Е. М.: Изд-во ВИНТИ, 1979, с. 145–153, 310–311.
2. Reese E. T., Parrish F. W. Carbohydr. Res., 1971, v. 18, № 2, p. 381–388.
3. Reese E. T. Adv. in Chem. Ser., 1969, v. 95, p. 26–33.
4. Силицын А. П., Клесов А. А. Биохимия, 1981, т. 46, вып. 2, с. 202–213.
5. Klyosov A. A., Rabinowitch M. L. In: Enzyme engineering: future directions / Eds Wingard L. B., Berezin I. V., Klyosov A. A. N. Y.: Plenum Press, 1980, p. 83–163.
6. Ленинджер А. Л. В кн.: Биохимия, М.: Мир, 1976, с. 273.
7. Klor W., Koosman P. Biochim. et biophys. acta, 1965, v. 99, № 1, p. 101–120.
8. Eriksson K. E., Holmark B. H. Arch. Biochem. and Biophys., 1969, v. 133, № 2, p. 233–237.
9. Shikata S., Nisizawa K. J. Biochem., 1975, v. 78, p. 499–512.
10. Клесов А. А., Рабинович М. Л., Силицын А. П., Чурилова Н. В., Григораш С. Ю. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1225–1242.
11. Максимов В. И. Успехи соврем. биол., 1981, т. 89, вып. 1, с. 41–57.
12. Reese E. T. Recent. Adv. Phytochem., 1977, v. 11, № 2, p. 311–326.
13. Хорлин А. Я. В кн.: Структура и функция активных центров ферментов / Ред. Браунштейн А. Е. М.: Наука, 1974, с. 118–156.
14. Рабинович М. Л., Клесов А. А., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1979, т. 246, № 2, с. 500–504.
15. Березин И. В., Рабинович М. Л., Силицын А. П. Биохимия, 1977, т. 42, № 9, с. 1631–1636.
16. Somogyi M. J. Biol. Chem., 1952, v. 195, № 1, p. 19–27.

Поступила в редакцию
21.X.1981

SUBSTITUTED CELLODEXTRINE — A NEW SUBSTRATE FOR THE SELECTIVE ASSAY OF EXO-1, 4- β -GLUCOSIDASE IN CELLULASE COMPLEXES

RABINOWITCH M. L., MARTIANOV V. A., CHUMAK G. A., KLYOSOV A. A.

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow;
A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow

A new substrate, which is a substituted cellodextrine, was proposed for the determination of exo-glucosidase (EC 3.2.1.74) activity. This compound was obtained as a result of hydrolysis of CM-cellulose by endoglucanase (a cellulase complex) in the presence of cellobiase. Using cellulase preparation of *Geotrichum candidum* with an added cellobiase, cellodextrine of polymerization degree of 20-21 and substitution degree of 0,79 was prepared. Unsubstituted glucose residues in the cellodextrine are not found more than three in succession, those at the non-reducing end can be split off by exo-glucosidase of cellulase from *Trichoderma viride*, while endoglucanase, cellobiohydrolase, and cellobiase do not attack this cellodextrine. Utility of the obtained dextrines for assaying exoglucosidases in the cellulase complexes was demonstrated.