



УДК 577.154

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

IV. ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И СТРУКТУРНЫХ ФАКТОРОВ СУБСТРАТА
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА*Блесов А. А., Ситицын А. П.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
кафедра химической энзимологии*

Изучено влияние основных физико-химических и структурных факторов целлюлозы на скорость и степень ее ферментативного гидролиза. Исследованы препараты целлюлозы различного происхождения, некоторые из них подвергались различным видам обработки — механической (измельчение), физической (γ -облучение) и химической (регенерация из кадоксена и фосфорной кислоты). Показано, что средний размер частиц и степень полимеризации целлюлозы практически не влияют на эффективность ферментативного гидролиза, в то время как увеличение удельной поверхности и уменьшение степени кристалличности приводят к соответствующему возрастанию скорости ферментативного гидролиза (коэффициенты корреляции соответствующих линейных зависимостей равны 0,89 и 0,92). γ -Облучение нативной целлюлозы приводит к резкому уменьшению степени полимеризации (от 1100 до 19 для различных доз облучения, вплоть до 118 Мрад), но практически не изменяет степень кристалличности и не влияет на реакционную способность целлюлозы по отношению к целлюлолитическим ферментам.

В предыдущих статьях [1—5], посвященных ферментативному гидролизу целлюлозы, мы уделяли внимание в основном энзимологической стороне данной проблемы — составу целлюлазных комплексов из различных источников, свойствам целлюлолитических ферментов, а также кинетике и механизмам ферментативного превращения целлюлозы. Основным результатом этих исследований явилась разработка основ кинетической теории действия полиферментных систем целлюлазного комплекса на растворимые и нерастворимые производные целлюлозы и определении роли индивидуальных компонентов целлюлазного комплекса в механизме ферментативного превращения целлюлозы. Существует, однако, другая сторона данной проблемы, которую можно отнести скорее к биоорганической и физико-органической химии, а именно выявление роли структурных факторов самой целлюлозы в эффективности ее ферментативного превращения.

В изучении структуры целлюлозы [6, 7], а также роли ее структурных факторов в эффективности ее ферментативного гидролиза [8—13] достигнуты определенные успехи. Однако работы, в которых проводилось бы комплексное изучение влияния различных физико-химических и структурных факторов целлюлозы на эффективность ферментативного гидролиза, в литературе практически отсутствуют.

В настоящей статье представлены результаты наших исследований по влиянию размеров частиц, степени полимеризации, степени кристалличности

Таблица 1

Влияние физико-химических и структурных факторов целлюлозы на эффективность ее ферментативного гидролиза (см. также табл. 2 и 3)

Номер препарата	Целлюлоза	Размер частиц ^{1*} , мкм	Степень полимеризации	Удельная поверхность ^{2*} , м ² /г	Степень кристалличности, %		Реакционная способность	
					сухих препаратов	увлажненных и высушенных препаратов	начальная скорость гидролиза, г/л·ч	выход глюкозы за 24 ч, г/л
1	Хлопковый линт ^{3*} (1)	Волокна	1100	0,17	85	86	0,09	1,8
2	То же (2)	»	950	0,24	—	—	0,09	2,0
3	» (3)	»	1200	0,19	79	82	0,12	1,8
4	Линт (1), измельчен на вибромельнице, время измельчения 2 мин	32	870	0,27	65	69	0,16	2,0
5	Линт (2), измельчен на шаровой мельнице	23	440	0,59	77	79	0,61	5,8
6	То же	56	770	0,36	—	75	0,40	4,9
7	Линт (2), измельчен на вибромельнице, время измельчения 5 мин	30	620	0,54	39	66	0,41	3,5
8	МКЦ ^{4*}	23	170	0,31	65	65	0,39	6,3
9	МКЦ ^{5*}	24	160	0,30	68	70	0,39	5,2
10	Целлюлоза порошковая	27	260	0,45	—	70	0,33	5,1
11	α-Целлюлоза	30	840	0,69	55	64	0,45	6,8
12	Регенерированная целлюлоза (при обработке нативного линта фосфорной кислотой)	Волокна	800	1,05	—	35	0,84	9,0
13	То же (при обработке измельченного линта фосфорной кислотой)	»	980	0,90	—	30	1,05	9,5
14	То же (при обработке нативного линта кадоксеном)	»	—	1,2	—	32	0,96	9,0
15	То же (при обработке измельченного линта кадоксеном)	»	380	1,1	—	16	1,15	10

^{1*} Для порошкообразных целлюлозных материалов.

^{2*} Доступная молекулам белка (пероксидазы).

^{3*} Линт разных партий.

^{4*} Микросталлическая целлюлоза, для колоночной хроматографии.

^{5*} То же, для тонкослойной хроматографии.

Таблица 2

Влияние механического измельчения на структуру хлопкового линта и эффективность его ферментативного гидролиза

Номер препарата	Время измельчения на вибромельнице, мин	Размер частиц, мкм	Степень полимеризации	Удельная поверхность, м ² /г	Степень кристалличности, %		Начальная скорость гидролиза, г/л·ч	Выход глюкозы за 24 ч, г/л
					сухих препаратов	увлажненных и высушенных препаратов		
16	0	Волокна	1100	0,17	85	86	0,09	1,8
17	2	32	870	0,27	65	69	0,16	2,0
18	2,5	22	420	0,27	—	—	0,25	3,5
19	3	23	440	0,29	—	—	0,25	3,0
20	5	19	510	0,28	—	—	0,41	5,2
21	7	19	490	0,32	—	—	0,44	6,0
22	10	19	430	0,30	30	54	0,61	6,6
23	15	18	320	0,45	—	—	0,57	6,5
24	20	17	280	0,54	25	52	0,56	6,2

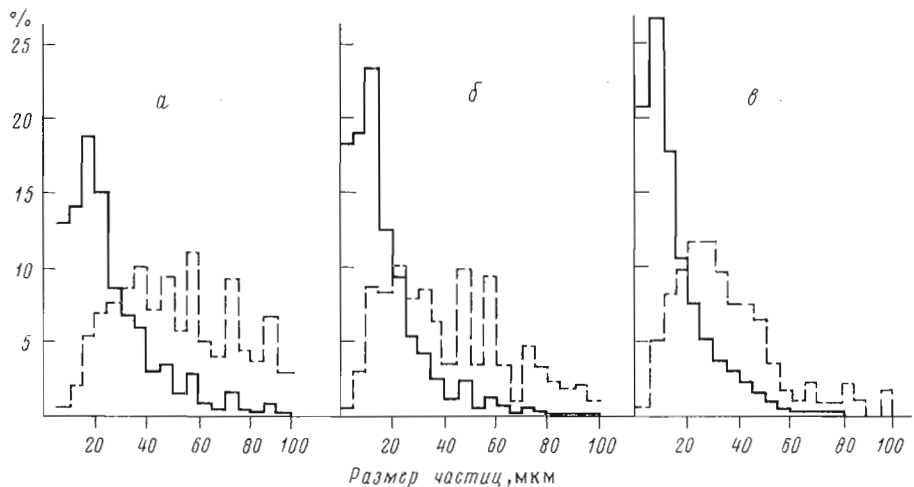


Рис. 1. Распределение частиц измельченного хлопкового лinters по относительному числу частиц данного размера (сплошная линия) и по относительной площади, занимаемой данными частицами (пунктир). Время измельчения лinters на вибрмельнице 2 (а), 2,5 (б), 15 мин (в)

сти и удельной поверхности субстрата на скорость и глубину ферментативного гидролиза препаратов целлюлозы различного происхождения, подвергнутых различным видам физической, механической и химической обработки.

Выбор целлюлазного препарата. В качестве ферментного препарата нами был выбран композиционный целлюлазный комплекс, состоящий из целлюлазных препаратов *Trichoderma reesei* и *Aspergillus niger* в весовом соотношении 1:1. Целлюлазный комплекс из *T. reesei* характеризуется сравнительно высокой эндоглюказазной и экзоглюкозидазной активностями, но низкой активностью целлобиазы (см. «Экспериментальную часть»). Как следствие этого, действие целлюлазного комплекса из *T. reesei* на нерастворимую целлюлозу приводит к образованию сравнительно высоких концентраций целлобиозы и малых — глюкозы [14, 15]. Целлюлазный комплекс из *Asp. niger*, напротив, содержит преимущественно целлобиазу, и его действие на целлюлозу приводит к образованию только глюкозы, однако скорость реакции недостаточно высока [14—16]. Комбинация этих двух препаратов приводит к образованию преимущественно глюкозы (95—97% по отношению к растворимым продуктам ферментативного гидролиза хлопка) и к существенному увеличению скорости гидролиза целлюлозы (см. [17]).

Влияние размера частиц целлюлозы. Средний размер частиц целлюлозы не определяет в сколько-нибудь заметной степени эффективность ее ферментативного гидролиза. Об этом свидетельствует тот факт, что коэффициент корреляции между средним размером частиц и начальной скоростью гидролиза (табл. 1 и 2), равен всего 0,29, а между средним размером частиц и выходом глюкозы через 24 ч гидролиза равен 0,28. К такому же выводу пришли авторы работы [18], которые не нашли различий между скоростью гидролиза или глубиной реакции для двух образцов микрокристаллической целлюлозы со средними размерами частиц 38 и 90 мкм. Они отметили, что «этот факт представляется неожиданным, поскольку из общих соображений скорость гидролиза должна быть пропорциональна поверхности частиц» [18].

Однако, на наш взгляд, полученные результаты не являются неожиданными, поскольку образцы измельченной целлюлозы (в том числе и микрокристаллической целлюлозы, см. далее табл. 4) характеризуются весьма широким распределением по размерам частиц (табл. 3, 4, рис. 1),

Таблица 3

Среднечисловое распределение частиц измельченного хлопкового линта
по размерам и занимаемой площади
Время обработки линта на вибромельнице 7 мин

Размер частиц, мкм	Число частиц		Площадь, занимаемая части- цами (проекция)	
	абсолютное число в выборке	%	абс. величина, мкм ²	%
1-6	308	21	2960	0,7
6-11	392	27	22 200	5,2
11-16	250	18	35 800	8,4
16-21	163	11	43 800	10
21-26	115	8,0	49 900	12
26-31	97	5,5	50 400	12
31-36	48	3,3	42 300	10
36-41	29	2,0	33 800	8,0
41-46	23	1,6	34 200	8,0
46-51	16	1,1	29 600	7,0
51-56	8	0,6	18 000	4,2
56-61	4	0,3	10 800	2,5
61-66	2	0,1	6330	1,5
66-71	3	0,2	11 100	2,6
71-76	1	0,07	4240	1,0
76-81	1	0,07	4840	1,1
81-86	2	0,1	11 000	2,6
86-91	1	0,07	6150	1,4
91-96	0	0	0	0
96-101	1	0,07	7620	1,8
Всего	1446	100	425 000	100

и понятие среднего размера в этом случае довольно условная характеристика. Естественно, если бы частицы имели одинаковые размеры, то более мелкие были бы предпочтительны для гидролиза, поскольку они характеризуются большей удельной поверхностью. Однако при широком распределении частиц по размерам поверхность частиц связана довольно сложным соотношением с размерами, что иллюстрируется данными, приведенными в табл. 3, 4 и на рис. 1. Так, площадь, занимаемая частицами целлюлозы (точнее, проекция этих частиц в поле оптического микроскопа, см. «Экспериментальную часть»), которая в данном случае может быть использована как грубая оценка поверхности субстрата, характеризуется значительно более широким распределением, чем размеры частиц (рис. 1). Видно, что минимальный вклад в площадь (проекцию) дают частицы минимального и максимального размера и основная доля суммарной площади, занимаемая частицами целлюлозы, приходится на частицы, размер которых несколько выше среднего в данной партии. Иначе говоря, если рассматривать размеры частиц как единственный параметр, определяющий эффективность ферментативного гидролиза, то наименее существенны для реакции самые мелкие и самые крупные частицы.

То, что сами по себе размеры частиц целлюлозы не определяют эффективность ферментативного гидролиза, следует также из сопоставления скоростей гидролиза волокнистых и порошковых целлюлозных материалов. Размеры волокон целлюлозы (природный хлопковый линт, а также линт, регенерированный после растворения в кадокселе или фосфорной кислоте) существенно превышают размеры частиц измельченной целлюлозы (это видно как с помощью светового микроскопа, так и из непосредственных наблюдений). Тем не менее необработанный линт имеет минимальную, а регенерированный — максимальную реакционную способность из всех изученных нами целлюлозных субстратов.

Таким образом, из всех приведенных выше данных ясно, что средний размер частиц субстрата (особенно при широком распределении размеров)

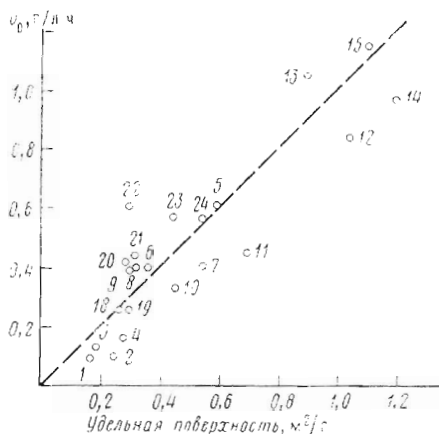


Рис. 2

Рис. 2. Влияние удельной поверхности целлюлозы на начальную скорость образования глюкозы под действием композиционного целлюлазного препарата. Нумерация препаратов целлюлозы — в табл. 1 и 2

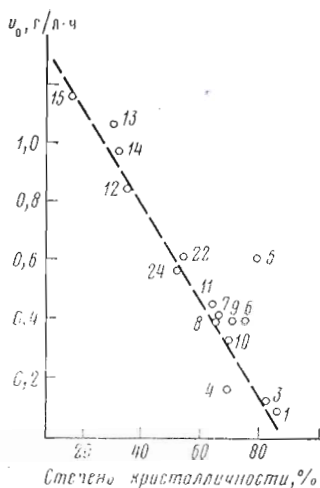


Рис. 3

Рис. 3. Влияние степени кристалличности целлюлозы (после предварительного увлажнения и высушивания) на начальную скорость образования глюкозы под действием композиционного целлюлазного препарата. Нумерация препаратов целлюлозы — в табл. 1 и 2

не может быть тем параметром, который контролирует эффективность ферментативного гидролиза целлюлозы и информация о котором была бы необходима для предсказания реакционной способности субстрата по отношению к целлюлолитическим ферментам.

Влияние степени полимеризации (СП) целлюлозы на эффективность ферментативного гидролиза в литературе почти не изучалось. Лишь в работе [19] было определено влияние СП трех образцов целлюлозосодержащих веществ, предварительно обработанных серной кислотой, на степень их конверсии. Авторы пришли к заключению, что уменьшение СП целлюлозы после предобработки не коррелирует с увеличением ее реакционной способности.

В табл. 1, 2 и 5 приведены величины СП для препаратов целлюлозы, как природной, так и обработанной различными способами. Корреляция между этими величинами и начальной скоростью гидролиза целлюлозы практически отсутствует (коэффициент корреляции равен 0,22). Аналогично, значимая линейная корреляция отсутствует между СП и выходом глюкозы через 24 ч гидролиза (коэффициент корреляции равен 0,32). Действительно, препараты целлюлозы, имеющие максимальную СП среди изученных образцов (нативный хлопковый линт — 1200, 1100 и 950, регенерированная целлюлоза — 980 и 800, α -целлюлоза — 840), отличаются друг от друга по реакционной способности почти на порядок (начальные скорости гидролиза равны 0,09—0,12 для нативного линта, 0,84 и 1,05 для регенерированной целлюлозы и 0,45 для α -целлюлозы), перекрываясь по эффективности гидролиза с целлюлозой, имеющей минимальные СП (280—320 для измельченного линта, 160—170 для микрокристаллической целлюлозы при начальных скоростях гидролиза 0,4—0,6 г/л·ч).

Тот факт, что СП практически не влияет на эффективность ферментативного гидролиза целлюлозы, особенно наглядно иллюстрируется данными табл. 5, где показана реакционная способность целлюлозы, подвергнутой действию γ -излучения в различных дозах. Видно, что при увеличении дозы облучения от нуля до 118 Мрад величина СП уменьшается более чем в

Среднечисловое распределение частиц микрокристаллической целлюлозы по размерам и занимаемой площади

Размер частиц, мкм	Число частиц		Площадь, занимаемая частицами (проекция)	
	абсолютное число в выборке	%	абс. величина, мкм ²	%
5-10	97	12	4290	1,2
10-15	80	10	9800	2,8
15-20	174	22	41 900	12
20-25	233	30	92 600	26
25-30	109	14	64 700	19
30-35	52	6,6	43 100	12
35-40	20	2,5	22 100	6,3
40-45	12	1,5	17 000	4,9
45-50	6	0,7	10 600	3,1
50-55	1	0,13	2160	0,7
55-60	2	0,25	5190	1,5
60-65	0	0	0	0
65-70	0	0	0	0
70-75	0	0	0	0
75-80	2	0,25	9430	2,7
80-85	1	0,13	5350	1,5
85-90	0	0	0	0
90-95	2	0,25	13 400	3,9
95-100	0	0	0	0
100-105	1	0,13	8250	2,4
Всего	791	100	350 000	100

50 раз, в то время как эффективность ферментативного гидролиза практически не изменяется. Характерно, что при этом почти не изменяется и степень кристалличности целлюлозы. Роль этого явления в определении эффективности ферментативного гидролиза целлюлозы обсуждается ниже.

Влияние удельной поверхности целлюлозы на результаты ферментативного превращения из общих соображений должно быть значительным. Известно, что необходимым этапом в осуществлении ферментативного гидролиза целлюлозы является адсорбция целлюлолитических ферментов на поверхности субстрата [16] и в ряде случаев показана определенная корреляция между количеством адсорбированного фермента и скоростью ферментативной реакции [16, 20]. Очевидно, что количество адсорбированного фермента в свою очередь должно зависеть от величины поверхности нерастворимого субстрата.

Изучение влияния удельной поверхности целлюлозы на скорость и степень ее ферментативного гидролиза было проведено в ряде работ [13, 21, 22]. Однако каких-либо количественных данных не было получено.

По-видимому, только в работе [8] были проведены количественные исследования влияния удельной поверхности субстрата на скорость ферментативного гидролиза. Ее авторы пришли к заключению, что удельная поверхность целлюлозы не коррелирует сколь-либо определенно со скоростью гидролиза субстрата. Однако в этой работе удельная поверхность целлюлозы была определена методом адсорбции газообразного азота. Структурная и поверхностная неоднородность целлюлозы вызывает необходимость определения удельной поверхности при изучении ферментативного гидролиза целлюлозы другим способом. На наш взгляд, его надо проводить с учетом доступности этой поверхности молекулам целлюлолитических ферментов, а не с помощью формальных в данном случае методов адсорбции низкомолекулярных газовых смесей. Иными словами, метод адсорбции азота должен скорее характеризовать «тонкую структуру» поверхности целлюлозы, которая может не иметь существенного отношения к действию целлюлолитических ферментов.

Влияние γ -облучения на структуру хлопкового линта и эффективность его ферментативного гидролиза

Доза облучения, Мрад	Степень полимеризации	Степень кристалличности ^{1*} , %	Начальная скорость гидролиза ^{2*} , г/л·ч	Выход глюкозы за 48 ч, г/л
0	1100	85	0,09	2,3
1,7	680	86	0,10	2,2
5,2	560	86	0,10	2,0
12	250	86	0,11	2,2
29	140	85	0,10	2,3
43	110	84	0,09	1,7
118	49	84	0,11	1,6

^{1*} Сухих препаратов. Предварительное увлажнение не проводилось.

^{2*} Начальная скорость образования глюкозы под действием композиционного целлюлозного препарата (см. текст).

В настоящей работе удельную поверхность целлюлозных субстратов определяли путем регистрации адсорбции пероксидазы — инертного по отношению к целлюлозе белка. Выбор пероксидазы был обусловлен простотой и надежностью определения пероксидазной активности, а также тем, что размеры ее молекулы и молекулярный вес достаточно близки к соответствующим показателям целлюлолитических ферментов [13, 23]. Следует указать также, что удельная поверхность целлюлозы, определенная в работе [8], почти не изменялась (в пределах $\pm 12\%$) при интенсивном измельчении субстрата. Напротив, по нашим данным (табл. 2), удельная поверхность хлопкового линта, измеренная с помощью адсорбции белка, при интенсивном измельчении возрастает довольно значительно. Далее, удельная поверхность «тонкой структуры» используемого нами образца микрокристаллической целлюлозы, определенная методом термодесорбции азотно-водородной газовой смеси (см. «Экспериментальную часть»), равна $2,2 \text{ м}^2/\text{г}$ ($1,84 \text{ м}^2/\text{г}$ для другого образца микрокристаллической целлюлозы, определенной в работе [8]), тогда как удельная поверхность того же препарата, доступная пероксидазе, составляет $0,30 \text{ м}^2/\text{г}$ (табл. 1). По-видимому, эта разница отражает структурную неоднородность целлюлозы по отношению к адсорбции низкомолекулярных газов, с одной стороны, и высокомолекулярных белков — с другой.

Определив удельную поверхность ряда целлюлозных субстратов с помощью адсорбции пероксидазы и сопоставив полученные данные с эффективностью ферментативного гидролиза целлюлозы, мы обнаружили определенную количественную взаимосвязь между этими величинами (рис. 2). Коэффициент корреляции между удельной поверхностью данных субстратов и начальной скоростью ферментативного гидролиза равен $0,89$, а между удельной поверхностью и выходом глюкозы через 24 ч — $0,84$. Таким образом, величина удельной поверхности субстрата в значительной степени определяет скорость ферментативного гидролиза целлюлозы.

Влияние степени кристалличности (СК) целлюлозы. Недавно были опубликованы сразу три работы [8, 11, 12], где степень кристалличности целлюлозных субстратов, определенную с помощью метода рентгеновской дифракции, сопоставляли с глубиной ферментативного гидролиза целлюлозы. Несмотря на сравнительно небольшое число использованных субстратов, в работах [8, 11] была показана количественная взаимосвязь между этими величинами. Однако в работе [11] не учитывалось влияние поверхности субстрата, а авторы [8] пришли к выводу, что удельная поверхность целлюлозы не играет заметной роли в определении эффективности ферментативного гидролиза, и приписали основное значение влиянию кристалличности. Исходя из этого, мы определили удельную поверхность (см. выше) и степень кристалличности более 20 препаратов целлю-

лозы и изучили влияние данных параметров на скорость и степень ферментативного гидролиза (табл. 1 и 2).

При обсуждении влияния СК на реакционную способность целлюлозы необходимо принимать во внимание возможность частичной рекристаллизации достаточно аморфных сухих препаратов целлюлозы под действием воды (см. [6], т. 1, с. 43–53, 91–116) при осуществлении ферментативного гидролиза. В случае регенерированной целлюлозы методика ее получения (см. «Экспериментальную часть») вообще не позволяет избежать воздействия воды, и для того чтобы по возможности стандартизировать подготовку субстратов, степень их кристалличности определяли также после специального увлажнения и последующего высушивания целлюлозы. Из табл. 1 и 2 видно, что в случае целлюлозы, характеризующейся достаточно высоким содержанием упорядоченных участков (нативный хлопковый линт, микрорекристаллическая целлюлоза), увлажнение лишь незначительно влияет на СК, но заметно увеличивает СК субстратов, измельченных (и соответственно аморфизованных) в сухом виде.

Как видно из рис. 3, выявляется достаточно четкая линейная взаимосвязь между начальной скоростью гидролиза целлюлозных субстратов и СК (определенной после предварительного увлажнения и высушивания). Коэффициент корреляции данной зависимости (0,92) является наивысшим среди возможных комбинаций зависимостей между СК сухих или предварительно увлажненных препаратов, с одной стороны, и начальной скоростью гидролиза или выхода глюкозы после 24 ч гидролиза — с другой (для трех остальных комбинаций величины коэффициентов корреляции равны 0,63; 0,51 и 0,88, последний относится к зависимости между СК предварительно увлажненных препаратов целлюлозы и выходом глюкозы через 24 ч реакции).

Поскольку в условиях опыта начальная скорость гидролиза целлюлозы, как правило, почти пропорциональна начальной концентрации субстрата, корреляция между СК целлюлозы и начальной скоростью гидролиза может в некотором приближении означать пропорциональность между начальной концентрацией доступных участков субстрата и начальной скоростью реакции. Если это предположение верно, то СК целлюлозы во многих случаях является мерой реальной концентрации субстрата (и связана с ней обратно пропорциональной зависимостью) в отличие от весовой концентрации. По-видимому, именно в этом заключается смысл влияния СК целлюлозы на эффективность ферментативного гидролиза.

Обращает на себя внимание определенная взаимосвязь между СК целлюлозы и величиной ее удельной поверхности. Коэффициент корреляции данной зависимости равен 0,86. Действительно, практически все образцы высококристаллической целлюлозы, приведенные в табл. 1 и 2 (нативный линт, микрорекристаллическая целлюлоза), характеризуются достаточно малой удельной поверхностью (0,17–0,31 м²/г), в то время как большинство образцов аморфизованной целлюлозы (измельченный линт, регенерированная целлюлоза) имеет достаточно развитую удельную поверхность (0,5–1,2 м²/г). Этот факт, вообще говоря, не представляется неожиданным в свете морфологических особенностей целлюлозы — разупорядочение ее структуры вполне может приводить к увеличению поверхности, доступной для связывания белковых молекул.

Итак, для оценки реакционной способности целлюлозы по отношению к действию целлюлолитических ферментов достаточно определить один из параметров — степень кристалличности или удельную поверхность субстрата. Определение СК с помощью рентгеновской дифракции представляется нам более простым и удобным и более стандартизируемым, чем определение удельной поверхности. Этот подход, сопряженный с предварительной обработкой целлюлозы (физической, механической или химической), позволит получать целлюлозу для последующего ферментативного гидролиза с заранее заданной реакционной способностью субстрата.

Экспериментальная часть

В работе использованы коммерческие целлюлазные комплексы из грибов *T. reesei* (Novo, Дания) и *Asp. niger* (Serva, ФРГ). Активности отдельных компонентов целлюлазных комплексов (ед./г препарата): для *T. reesei* — эндоглюканаза (КФ 3.2.1.4) — 3000, экзоглюкозидаза (КФ 3.2.1.74) — 350, целлюбиаза (КФ 3.2.1.21) — 20; для *Asp. niger* — эндоглюканаза — 130, экзоглюкозидаза — 20, целлюбиаза — 400. Приготовление растворов целлюлазных препаратов описано в работе [15]. Для гидролиза целлюлозы использовали композиционный целлюлазный препарат, содержащий комплексы из *T. reesei* и *Asp. niger* в весовом соотношении 1:1.

Хлопковый линт (ГОСТ 3818.0-72, 4-й сорт, III тип) представляет собой почти чистую целлюлозу (коротковолокнистый хлопок). Отдельные партии линта получены в ЦНИИХпром, Ташкент; в СредазНИИПищепром, Ташкент; во ВНИИбиотехника, Москва (нумерация препаратов соответственно 1—3 в табл. 1). Линт измельчали в течение 2—20 мин на технических шаровых мельницах (препараты 5, 6) и на шаровой вибромельнице [15] при частоте 1500 колебаний в 1 мин (препараты 17—24 в табл. 2). Описание вибромельницы дано в работах [15, 24].

Микрокристаллическая целлюлоза (препараты 8 и 9 в табл. 1) — производства фирмы «Chemapol» (ЧССР). Целлюлоза порошковая (препарат 10), фракция 0,10—0,25 мм — производства Олайнского завода химреактивов. α -Целлюлоза (препарат 11) — производства фирмы «Sigma» (США), № С-8002, Lot 17С-0347.

Определение активностей отдельных компонентов целлюлазного комплекса (в международных единицах), а также методы регистрации образующихся в ходе реакции глюкозы и восстанавливающих сахаров подробно описаны в работе [1].

Изучение кинетики ферментативного гидролиза целлюлозы проводили на качалке (400 колебаний в 1 мин) при pH 4,5 (0,1 М ацетатный буфер) в термостатируемых при 40°С ячееках объемом 50 мл. К навеске субстрата добавляли раствор композиционного ферментного препарата (в концентрации 0,8 г/л) и, далее, фильтруя через вату, отбирали первую пробу (объемом 0,5 мл) и определяли в ней содержание глюкозы и восстанавливающих сахаров. Последующую пробу отбирали через 0,5 ч и далее — через каждые 1—3 ч. При необходимости отобранные пробы разбавляли тем же буферным раствором. Концентрация целлюлозных субстратов во всех случаях составляла 10 г/л.

Кадоксен получали добавлением 20 г окиси кадмия к смеси, содержащей 105 мл 70% этилендиамина и 180 мл дистиллированной воды (по модифицированной методике [25]). Смесь перемешивали при 4°С в течение 10—12 ч и центрифугировали 30 мин при 8000 об/мин. Прозрачный раствор использовали для растворения целлюлозы.

Обработку хлопкового линта кадоксеном проводили по методике [24], постепенно добавляя субстрат в 100 мл кадоксена (до концентрации 0,04 г/мл) при интенсивном перемешивании при комнатной температуре в течение 1 ч. При этом наблюдалось первоначальное желатинизирование линта с последующим его растворением. Вязкий раствор целлюлозы разбавляли 2 л водно-ацетоновой смеси (1:1 по объему) и многократно промывали образовавшийся осадок регенерированной целлюлозы дистиллированной водой. Полученную таким образом целлюлозу хранили в воде.

Обработку хлопкового линта фосфорной кислотой проводили согласно [26—28]. В 250 мл предварительно охлажденной при 0°С 88% фосфорной кислоты вносили при интенсивном перемешивании 5 г линта. Смесь перемешивали 4 ч при охлаждении. При этом наблюдалось первоначальное желатинизирование и затем растворение линта. Полученный однородный раствор разбавляли 2 л водно-ацетоновой смеси (1:1 по объему) и образовавшийся осадок регенерированной целлюлозы тщательно промывали

большим количеством дистиллированной воды до нейтральной реакции (по лакмусу) промывных вод и осадка. Полученную целлюлозу хранили в воде.

СП целлюлозы находили, растворяя ее в кадоксене и определяя вязкость полученного раствора (см. [6], т. 1, с. 279—308) с помощью вискозиметра Оствальда (объем шарика 2,5 мл, время истечения кадоксена 90—100 с при 25° С). СП определяли по формуле [29]

$$[\eta] = 7 \cdot 10^{-3} \cdot \text{СП}^{0,9},$$

где $[\eta]$ — характеристическая вязкость, которую в свою очередь рассчитывали по формуле [29]

$$[\eta] = \frac{-1 + \sqrt{1 + 2\eta_{\text{уд}}}}{c}.$$

Здесь $\eta_{\text{уд}}$ — удельная вязкость, c — концентрация целлюлозы в растворе (г/100 мл). Удельную вязкость определяли непосредственно из экспериментальных данных по формуле

$$\eta_{\text{уд}} = \eta_{\text{отн}} - 1 = \frac{\tau}{\tau_0} - 1,$$

где $\eta_{\text{отн}}$ — относительная вязкость, τ — время истечения раствора целлюлозы в кадоксене, τ_0 — время истечения кадоксена. В экспериментах обычно использовали растворы целлюлозы в кадоксене в концентрации 1—4 г/мл в зависимости от морфологии целлюлозы. Порошкообразные образцы целлюлозы (измельченный хлопковый линт и микрокристаллическая целлюлоза) полностью растворялись в кадоксене в течение 10—60 мин, волокнистые образцы — в течение 3—10 ч.

Степень кристалличности целлюлозы определяли методом дифракции рентгеновских лучей на установке УРС-50И, используя монохроматическое излучение (для монохроматизации применяли дифференциальные фильтры Росса) при длине волны 1,54 Å. Образцы целлюлозы, используемые для получения дифрактограмм, представляли собой спрессованные таблетки размером 27×18 мм (весом 400 мг). Расчет степени кристалличности по дифрактограммам проводили по методу [30, 31], определяя площади под пиками кристалличности и площади аморфного галло. При этом точки при углах рассеяния 2 θ , равных 5,19 и 30°, считались принадлежащими аморфному галло (высота аморфного галло при 19° была максимальной). В интервале углов 5—30° определяли сумму площадей под «кристаллическими пиками» K_1 и K_2 и площадь аморфного галло (A). Степень кристалличности рассчитывали по формуле [31]

$$\text{СК} = \frac{K_1 + K_2}{K_1 + K_2 + A} \cdot 100\%.$$

Общую удельную поверхность микрокристаллической целлюлозы измеряли с помощью метода термодесорбции азотно-водородной смеси по методике [32, 33]. Измерения удельной поверхности целлюлозных материалов, доступной молекулам белка, проводили с помощью изотерм адсорбции пероксидазы высокой степени очистки [34]. Расчеты проводили с использованием формулы

$$S_E = \frac{[E]_{\text{нас}} N_A s_E}{[S]},$$

где S_E — площадь поверхности целлюлозы, доступной молекулам белка (м²/г), $[E]_{\text{нас}}$ — насыщающая концентрация белка на поверхности целлюлозы при образовании монослоя (моль/л), N_A — число Авогадро (6,02 · 10²² моль⁻¹), s_E — площадь, занимаемая молекулой белка (для пероксидазы равна 9 · 10⁻¹⁸ м² [34]), $[S]$ — концентрация целлюлозы (г/л). Количество адсорбированной пероксидазы определяли по убыли фермента из раствора, определяя ферментативную активность кинетическим методом по методике [35] или по изменению оптической плотности раствора на длине

волны 403 нм (при концентрации пероксидазы выше $5 \cdot 10^{-7}$ М). Адсорбцию проводили при 25° С, процесс адсорбции заканчивался в течение 10 мин.

Облучение образцов нативного хлопкового линта проводили на γ -источнике ^{60}Co в Институте электрохимии АН СССР. Мощность дозы составляла $3 \cdot 10^{16}$ эВ/г·с, время облучения 1–68 ч. Облучение проводили на воздухе. Специальные опыты показали, что облучение линта в вакууме или линта, смоченного водным раствором хлористого кальция (при дозе $1,8 \cdot 10^{21}$ эВ/г, или 29 Мрад), не привело к заметным изменениям степени полимеризации полученной целлюлозы.

Размеры частиц целлюлозных материалов определяли методом дисперсионного анализа с использованием оптического микроскопа со сканирующим телеустройством «Квантиметр-720» (Cambridge Instrument, Англия) и автоматической системой расчета размера частиц с помощью ЭВМ фирмы «Hewlett-Packard» (США).

Коэффициенты корреляции линейных зависимостей рассчитывали с использованием вычислительной машины с программным управлением «Сейко-301» (Япония).

ЛИТЕРАТУРА

1. Клесов А. А., Рабинович М. Л., Синуцын А. П., Чурилова И. В., Григораш С. Ю. Ферментативный гидролиз целлюлозы. I. Активность и компонентный состав целлюлазных комплексов из различных источников.— Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1225–1242.
2. Клесов А. А., Рабинович М. Л., Чурилова И. В., Синуцын А. П., Григораш С. Ю., Тихонова Т. В., Малиновская Л. М. Ферментативный гидролиз целлюлозы. II. Свойства компонентов целлюлазных комплексов из различных источников.— Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1377–1395.
3. Синуцын А. П., Клесов А. А. Сравнительная роль экзо-1,4- β -глюкозидазы и целлобиазы при ферментативном гидролизе целлюлозы.— Биохимия, 1981, т. 46, вып. 2, с. 202–213.
4. 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. N. Y.: Plenum Press, 1980, v. 5, p. 153.
5. Рабинович М. Л., Клесов А. А., Березин И. В. Кинетика действия целлюлолитических ферментов из *Geotrichum candidum*. Вискозиметрический анализ кинетики гидролиза карбоксиметилцеллюлозы.— Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 3, с. 405–414.
6. Целлюлоза и ее производные /Ред. Байклз Н., Сегал Л. М.: Мир, 1974, т. 1, 2.
7. Роговин З. А. О фазовом состоянии целлюлозы.— Высокомолекулярн. соед., 1960, т. 2, № 10, 1588–1603.
8. Fan L. T., Lee Y.-H., Beardmore D. H. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effect of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis.— Biotechnol. and Bioeng., 1980, v. 22, № 1, p. 177–179.
9. Wood T. M. Enzymes and mechanisms involved in the solubilization of native cellulose.— Cienc. Biol. (Portugal), 1980, v. 5, № 1, p. 27–33.
10. Ryu D. D. Y., Mandels M. Cellulases: biosynthesis and applications.— Enzyme microb. Technol., 1980, v. 2, № 1, p. 91–102.
11. Tanaka M., Taniguchi M., Morita T., Matsuno R., Kamikubo T. Effect of chemical treatment on solubilization of crystalline cellulose wastes with *Fellicularia filamentosa* cellulase.— J. Ferment. Technol., 1979, v. 57, № 3, p. 186–190.
12. Sasaki T., Tanaka T., Nanbu N., Sato Y., Kainuma K. Correlation between X-ray diffraction measurements of cellulose crystalline structure and the susceptibility to microbia cellulase.— Biotechnol. and Bioeng., 1979, v. 21, p. 1031–1042.
13. Cowling E. B. Physical and chemical constraints in the hydrolysis of cellulose and lignocellulosic materials.— In: Cellulose as a chemical and energy resource. Symp. № 5 of Biotechn. Bioeng. Symp./Ed. Wilke C. R. N. Y. Intersci. Publ., 1975, p. 163–181.
14. Клесов А. А., Чурилова И. В. Гидролиз микрокристаллической целлюлозы под действием полиферментных целлюлазных комплексов различного происхождения.— Биохимия, 1980, т. 45, вып. 9, с. 1685–1694.
15. 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.
16. 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., Berezin I. V., Klyosov A. A. N. Y.: Plenum Press, 1980, p. 83–165.

17. Силицын А. П., Наджми Б., Клесов А. А. Ферментативное получение глюкозы из целлюлозы. Влияние состава целлюлозного препарата на эффективность гидролиза хлопкового лinters. — Прикл. биохимия и микробиол., 1981, т. 17, вып. 3, с. 315–327.
18. Shewale J. G., Sadana J. C. Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials by *Sclerotium rolfsii* culture filtrate for sugar production. — Can. J. Microbiol., 1979, v. 25, p. 773–783.
19. Knappert D., Grethlein H., Converse A. Partial acid hydrolysis of cellulose materials as a pretreatment for enzymatic hydrolysis. — 4 Joint US/USSR Enzyme Engineering Conference. New Orleans: Louisiana Proceedings, 1978, p. 403–419.
20. Huang A. A. Kinetic studies on insoluble cellulose — cellulase system. — Biotechnol. and Bioeng., 1975, v. 17, p. 1421–1433.
21. Stone J. E., Scallan A. M., Donefer E., Ahlyren E. Cellulose and their application. — Amer. Chem. Soc., Washington, D. C., 1969, p. 219–231.
22. Chose T. K., Das K. Economic evaluation of enzymatic utilization of waste cellulose materials. — Adv. Biochem. and Engng, 1971, v. 1, p. 55–76.
23. 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. Биол. химия. М.: ВИНТИ, 1978, т. 12, с. 49–91.
24. Ladisch M. R., Ladisch C. M., Tsao T. Cellulose to sugars: new path gives quantitative yield. — Science, 1978, v. 201, p. 743–745.
25. Wood T. M., McCrae S. I. The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. — Biochem. J., 1978, v. 171, № 1, p. 61–72.
26. Wood T. M., McCrae S. I. Cellulase from *Fusarium solani*: purification and properties of the component. — Carbohydr. Res., 1977, v. 57, № 1, p. 117–133.
27. Wood T. M. Purification and specificity of the β -(1 \rightarrow 4)-glucanase and the β -D-glucosidase components. — Biochem. J., 1971, v. 121, № 3, p. 353–362.
28. Shoemaker S. P., Brown R. D. Characterization of endo-1,4- β -D-glucanases purified from *Trichoderma viride*. — Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 523, p. 133–146.
29. Болотникова Л. С., Данилов С. Н., Самсонова Т. П. Метод определения вязкости и степени полимеризации целлюлозы. — Ж. прикл. химии, 1966, т. 39, № 1, с. 176–180.
30. Маргыню М. А., Вылегжанина К. А. Рентгенография полимеров. Л.: Химия, 1972, с. 28.
31. Китайгородский А. П. Рентгеноструктурный анализ микрокристаллических и аморфных тел. М.: Гос. изд-во технико-теоретич. литературы, 1952, с. 293.
32. Экспериментальные методы в адсорбции и газовой хроматографии / Ред. Киселев А. В., Древнин В. П. М.: Изд-во МГУ, 1973, с. 214.
33. Гаврилова Т. Б., Киселев А. В. Получение изотерм адсорбции и быстрое определение удельной поверхности газохроматографическим методом тепловой десорбции. — Ж. физ. химии, 1965, т. 39, № 10, с. 2582–2585.
34. Силицын А. П. Кинетические аспекты ферментативного получения глюкозы из полисахаридных субстратов. — Автореф. на соискание уч. ст. канд. хим. наук. М.: МГУ, 1978, с. 8.
35. Лебедева О. В., Угарова Н. Н., Березин И. В. Кинетическое изучение реакции окисления *o*-данилидина перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена. — Биохимия, 1977, т. 42, вып. 8, с. 1372–1379.

Поступила в редакцию 13.III.1981

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CELLULOSE. IV. EFFECT OF MAJOR PHYSICO-CHEMICAL AND STRUCTURAL FEATURES OF THE SUBSTRATE

KLYOSOV A. A., SENITSYN A. P.

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

A study was made of the effects of physico-chemical and structural properties of cellulose on the rate and extent of its enzymatic hydrolysis. Cellulose materials of various origin were tested, some of them being treated in different ways: mechanical treatment (milling), physical (γ -irradiation), and chemical (regeneration from cadoxen and phosphoric acid). It was shown that the average particle size and the polymerization degree of the substrates practically did not effect the enzymatic hydrolysis catalyzed by the cellulase complex of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. On the contrary, increase in the specific surface area and decrease in the crystallinity index lead to the respective increase in the initial velocity of the enzymatic hydrolysis (the respective linear correlation coefficients were equal to 0,89 and 0,92). γ -Irradiation of a native cellulose (cotton linter) caused a sharp decrease of the polymerization degree (from 1100 to 19 for various irradiation doses, up to 118 Mrad), but virtually did not influence both the crystallinity and reactivity of the cellulose towards the cellulolytic enzymes.