



УДК 577.154.33

РОЛЬ АДсорбЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ЭНДОГЛЮКАНАЗЫ
В ДЕГРАДАЦИИ КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ И АМОРФНОЙ
ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Блесов А. А.

*Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва**Черноглазов В. М., Рабинович М. Л., Синицын А. П.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Изучена роль адсорбции эндоглюканаз 12 целлюлазных комплексов в процессе гидролиза различных видов целлюлозы. На примере 10 образцов целлюлозы, различающихся физико-химическими параметрами (удельной площадью поверхности, степенью кристалличности, степенью полимеризации), показано, что для эффективности гидролиза аморфной целлюлозы определяющим является только количество адсорбированного на ней фермента, тогда как для гидролиза кристаллической целлюлозы важно также «качество» связывания, характеризуемое константой адсорбционного равновесия. Способность кристаллической целлюлозы к гидролизу при «прочном» связывании с ферментом повышается настолько, что составляет примерно 30% реакционной способности аморфной целлюлозы. Напротив, при относительно «слабой» адсорбции эндоглюканазы на поверхности кристаллической целлюлозы последняя остается практически полностью инертной по отношению к ферментативному гидролизу.

С начала 50-х годов в литературе по ферментативному гидролизу целлюлозы активно обсуждается вопрос: почему целлюлазные комплексы одних микроорганизмов расщепляют как нативную (кристаллическую), так и модифицированные (аморфную и растворимую) формы целлюлозы, тогда как другие гидролизуют только аморфный и растворимый субстрат [1—3]? Согласно ранней гипотезе Э. Риза [4], для гидролиза кристаллической целлюлозы необходимо присутствие в целлюлазном комплексе так называемого C_1 -фермента негидролитической природы, который превращает кристаллические участки в аморфные и таким образом облегчает деградацию целлюлозы эндо- и экзоферментами (« C_x -ферменты»). Напротив, в отсутствие C_1 -фермента ферменты C_x способны к гидролизу только аморфной и растворимой целлюлозы. Однако в ходе 30-летнего интенсивного изучения процесса ферментативного гидролиза целлюлозы не было обнаружено прямых экспериментальных доказательств существования негидролитического C_1 -фермента, и многие исследователи отказались от первоначальной C_1 — C_x -концепции, хотя термин « C_1 -фермент» еще широко используется в литературе как условное название фактора, определяющего способность целлюлазного комплекса к деградации кристаллической целлюлозы.

В настоящее время существует несколько гипотез, объясняющих механизм гидролиза высокоупорядоченной целлюлозы. Так, недавно Риз выдвинул предположение [2], что C_1 -фермент представляет собой особую эндо-1,4- β -глюканазу, действующую только на кристаллическую целлюлозу.

Авторы работы [5] выдвинули концепцию, согласно которой роль C_1 -фермента могут выполнять особые оксидазы, разрывающие водородные связи и разрушающие кристаллическую структуру субстрата. Однако другими исследователями [2, 3] в целлюлазных комплексах, активно деградировавших нативную целлюлозу, этот фермент не был обнаружен.

Бергхем и Петтерсон [6] считают, что первыми целлюлозу атакуют эндоглюканазы, статистически расщепляя участки с низкой кристаллич-

ностью. При этом образуется целлюлоза с меньшей степенью полимеризации, в которой расщепление кристаллических областей целиком определяется наличием в целлюлазном комплексе целлобиогидролазы.

Согласно теории Вуда [7], первым атакующим целлюлозу ферментом является также эндоглюканаза, однако последующее расщепление гликозидных связей кристаллической целлюлозы возможно лишь при образовании на поверхности субстрата белок-белковых комплексов между эндоглюканазой и целлобиогидролазой.

Распространенной в настоящее время является и концепция Нисидзавы [8], согласно которой эффективный гидролиз высокоупорядоченной целлюлозы происходит в результате совместного действия нескольких эндоглюканаз, различающихся между собой упорядоченностью действия по отношению к СМ-целлюлозе.

По нашему мнению, эти, а также целый ряд других представлений (подробно изложены в обзорах [1—3]) не только не позволяют предсказывать специфичность действия ферментов по отношению к кристаллическому субстрату, но и не могут объяснить целого ряда экспериментальных данных. Так, например, многие выделенные в высокоочищенном состоянии целлобиогидролазы не обладали способностью к глубокому гидролизу кристаллической целлюлозы [2, 3] (даже при сравнительно низких значениях степени полимеризации последней), что ставит под сомнение концепцию работы [6], а также множество других, в которых способность деградировать высокоупорядоченную целлюлозу целиком приписывается целлобиогидролазе. Остается неясным и тот факт, почему далеко не все эндоглюканазы проявляют синергизм с целлобиогидролазой [7]. Общими же недостатками вышеизложенных представлений является то, что, во-первых, большинство из них не вскрывают строгих физико-химических закономерностей ферментативного гидролиза целлюлозы и носят чисто описательный характер. При этом так называемые неполноценные целлюлазные препараты и причины их неспособности гидролизовать высокоупорядоченный субстрат обычно не анализируются. Во-вторых, изучение механизма гидролиза сводится, как правило, к изучению синергизма между отдельными компонентами, которые часто оказываются минорными в силу низких выходов по активности (обычно несколько процентов).

Мы представляем здесь данные, позволяющие под новым углом зрения представить механизм гидролиза кристаллической целлюлозы. Наша концепция отличается от вышеизложенных тем, что она объясняет закономерности гидролиза для целого ряда произвольно выбранных целлюлазных комплексов, причем фактор, который, по нашему мнению, определяет способность или неспособность целлюлазного препарата эффективно солиubilизировать высокоупорядоченную целлюлозу, имеет вполне определенный физико-химический смысл и является экспериментально определяемым. Это позволяет с единых позиций количественно описывать гидролиз целлюлозы независимо от ее структурной организации.

В работе [9] мы показали, что эндоглюканазы целлюлазных комплексов существенно различаются по адсорбционной способности (соотношение коэффициентов распределения — см. «Эксперим. часть» — 10 и более. В условиях адсорбции композиционного препарата K_p является единственным реальным критерием эффективности адсорбции эндоглюканазы. Он определяется в условиях линейности изотермы адсорбции и пропорционален константе адсорбции и величине максимальной адсорбции). Причем оказалось, что для всех 12 изученных целлюлазных комплексов существует зависимость: чем больше коэффициент распределения эндоглюканазы (в дальнейшем связывание для краткости именуется «прочным»), тем выше стационарная скорость (и глубина) гидролиза микрокристаллической целлюлозы. Так, если для прочносорбирующихся ферментов степень конверсии целлюлозы составляла 97—98%, то препараты с низкими значениями коэффициента распределения эндоглюканаз гидролизовали микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ) всего на 5—7% при той же активности ферментов по отношению к растворимым субстратам. На осно-

вании этих данных нами был сделан вывод, что прочность адсорбции эндоглюканазы, по-видимому, является фактором, определяющим способность целлюлазного комплекса эффективно деградировать высокоупорядоченную целлюлозу.

Развивая данное положение, мы представляем здесь доказательства, что способы ферментативного гидролиза кристаллической и аморфной целлюлозы принципиально различаются. В настоящей работе не детализируется, каким образом ферменты связываются с поверхностью целлюлозы — с участием активного центра или, напротив, путем взаимодействия «периферийной» — белковой части ферментной глобулы, либо, наконец, с помощью ее углеводной части. Эта информация не может быть получена при рассмотрении изотерм адсорбции, которые определялись в данной работе. Важно то, что, несмотря на «специфический» или «неспецифический» характер адсорбции ферментов на целлюлозе (в отношении участия активного центра в связывании), в любом случае эффективное взаимодействие эндоглюканазы с нерастворимым субстратом, выражаемое высоким коэффициентом распределения фермента между раствором и поверхностью целлюлозы, приводит к значительному увеличению скорости деградации кристаллической целлюлозы. Напротив, при относительно «слабой» адсорбции целлюлаз на поверхности кристаллической целлюлозы (даже при достаточно большой поверхностной концентрации фермента) последняя остается практически полностью инертной по отношению к ферментативному гидролизу.

Недавно было показано, что из структурных характеристик целлюлозы наибольшее влияние на скорость ее ферментативного гидролиза оказывают удельная поверхность и степень кристалличности [1, 10—12]. Удельная поверхность определяет количество глюкозидных связей субстрата, доступных действию ферментов целлюлазного комплекса, а степень кристалличности — свойственную им реакционную способность. Развивая эти представления, можно выделить два фактора, которые определяют скорость деградации нерастворимого субстрата. Так как процесс деградации нерастворимой целлюлозы протекает на границе раздела фаз, то, во-первых, это количество адсорбированного фермента (в данном случае эндоглюканазы), которое зависит от удельной поверхности субстрата и от константы адсорбции фермента. Вторым фактором является *реакционная способность гликозидных связей субстрата* в твердой фазе, зависящая от степени упорядоченности (кристалличности) целлюлозы и, как было показано нами в работе [9], также от константы адсорбции эндоглюканазы.

Однако до последнего времени не было достоверных экспериментальных данных, позволяющих с уверенностью разделить влияние обоих факторов. Более того, авторы обычно изолированно рассматривают роль той или иной структурной характеристики целлюлозы (например, [10]), хотя степень кристалличности, удельная поверхность и количество адсорбированных на поверхности целлюлозы ферментов являются, как правило, взаимозависимыми величинами. Например, большую эффективность гидролиза целлюлозы под действием ферментов с более высокой адсорбционной способностью [9] можно на первый взгляд объяснить только увеличением количества адсорбированного фермента. Из этого следует не совсем корректный вывод, что единственной причиной малой скорости гидролиза кристаллических субстратов по сравнению с аморфными (в особенности при использовании слабоадсорбирующихся ферментов) является меньшее количество адсорбированного фермента на поверхности кристаллического субстрата, так как известно, что аморфные формы целлюлозы часто имеют более развитую поверхность, чем кристаллические [12].

Поэтому для количественного изучения влияния прочности адсорбции эндоглюканазы на реакционную способность целлюлозы с различной степенью упорядоченности необходимы определенным образом поставленные эксперименты. Для этого нами были выбраны два целлюлазных комплекса (из гриба *Trichoderma reesei*, а также препарат производства фирмы «Rapidase»), содержащие различающиеся по адсорбционной способности

Характеристика целлюлазных препаратов, использованных в работе

Препарат	Коэффициент распределения эндоглюканазы, г/л	Удельная активность, ед. акт./г		
		Эндоглюканаза	Экзоглюкозидаза	Целлюбиаза
<i>Trichoderma viride</i>	0,37	240	100	80
» <i>reesei</i>	0,36	980	440	40
» <i>longibrachiatum</i>	0,35	560	140	60
<i>Geotrichum candidum</i>	0,30	850	190	190
<i>Aspergillus terreus</i>	0,13	1160	120	130
<i>T. koningii</i>	0,12	440	65	170
» <i>lignorum</i>	0,11	230	45	160
<i>Myrothecium verrucaria</i>	0,10	130	40	50
«Rapidase» (Франция)	0,04	420	6	<1
<i>Asp. niger</i> (Serva)	0,035	110	11	540
<i>T. viride</i> (Boehringer Mannheim, ФРГ)	0,03	570	6	370
<i>Asp. foetidus</i>	0,02	200	<1	380

Таблица 2

Структурные характеристики образцов целлюлозы, подвергавшихся ферментативному гидролизу

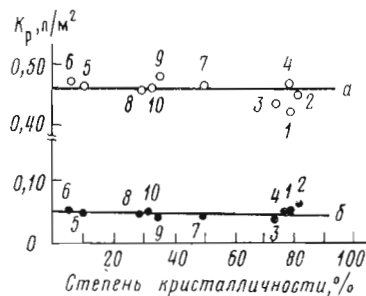
Номер препарата	Образец целлюлозы	Площадь поверхности, м ² /г	Степень кристалличности, %	Степень полимеризации
1	Хлопок, обработанный «Rapidase»	0,32	79	2600
2	Гидроцеллюлоза	1,52	81	200
3	МКЦ	0,80	74	140
4	МКЦ, обработанная «Rapidase»	0,71	78	145
5	H ₃ PO ₄ -регенерированная МКЦ	1,05	10	120
6	Кадоксен-регенерированная МКЦ	1,85	5	130
7	МКЦ, измельченная в течение 5 мин	0,68	50	145
8	То же, 15 мин	0,71	29	130
9	Хлопок, измельченный в течение 5 мин	0,75	35	560
10	Кадоксен-регенерированный измельченный хлопок	2,20	32	530

эндоглюканазы (соответственно прочно- и слабоадсорбирующиеся, табл. 1). Для изучения влияния степени кристалличности на скорость ферментативного гидролиза целлюлозы были получены 10 форм целлюлозы с различной степенью кристалличности и определены их удельные поверхности, доступные действию целлюлаз (табл. 2).

Далее необходимо было выяснить, зависит ли коэффициент распределения эндоглюканазы от степени кристалличности целлюлозы. Как видно из рис. 1, независимо от сорбционной способности эндоглюканаз количество адсорбированных ферментов не зависит от структуры целлюлозы и при равной поверхности целлюлозы в растворе определяется только адсорбционными свойствами эндоглюканазы.

Дальнейшие опыты проводились так, чтобы независимо от вида используемой целлюлозы во всех случаях была одинаковой поверхность субстрата (4 м²/л) в единице объема реакционной системы и поверхностная концентрация адсорбированного фермента (50 ед. акт. эндоглюканазы на 1 м², как для прочно-, так и для слабоадсорбирующихся ферментных препаратов). В этих условиях измеряли стационарную скорость ферментативного образования глюкозы из целлюлозы. Ясно, что при такой постановке эксперимента основным фактором, определяющим скорость ферментативного гидролиза аморфной или кристаллической целлюлозы, является ее собственная реакционная способность. Действительно, при увеличении степени кристалличности целлюлозы ее реакционная способность последовательно уменьшалась, причем этот эффект наблюдался как для прочно-, так и для слабоадсорбирующегося фермента (рис. 2). Однако выяснилось,

Рис. 1. Адсорбционная способность эндогликаназы целлюлозных комплексов *T. reesei* (а) и «Rapidase» (б) на целлюлозе различной степени кристалличности. Нумерация образцов целлюлозы дана в соответствии с табл. 2



что для слабосорбирующегося фермента по мере увеличения степени кристалличности целлюлозы скорость гидролиза снижается почти до нуля, тогда как для прочносорбирующегося она остается на достаточно высоком уровне даже для субстратов, имеющих наивысшую степень кристалличности (80%). Иначе говоря, при увеличении степени кристалличности от 5 до 80% реакционная способность целлюлозы к гидролизу, катализируемому слабосорбирующимся ферментом, уменьшается почти в 70 раз, а к катализируемому прочносорбирующимся — лишь в 3 раза. Это показывает, какую значительную роль играет фактор прочности адсорбции фермента в определении способности кристаллической целлюлозы к гидролизу.

Наряду с этим обнаружилось, что в случае аморфной целлюлозы ее способность к гидролизу практически не зависит от прочности адсорбции целлюлаз. Наиболее наглядно это видно из рис. 3, где представлен вклад адсорбционной способности фермента в реакционную способность субстрата в зависимости от степени его кристалличности. При малых степенях кристалличности целлюлозы эффективность адсорбции фермента не вносит существенного вклада в скорость гидролиза субстрата, тогда как при степени кристалличности свыше 50% этот вклад резко возрастает. Характерно, что экстраполяция зависимости к гипотетическому полностью аморфному субстрату дает значение относительной скорости, близкое к 1, которое в свою очередь равно отношению скоростей расщепления растворимой СМ-целлюлозы, для гидролиза которой адсорбционные характеристики ферментов, разумеется, не имеют значения.

Аналогичная зависимость была получена нами еще для 10 целлюлозных комплексов, эндогликаназы которых охватывали широкий спектр по адсорбционной способности (табл. 1). Как видно из рис. 4, при увеличении коэффициента распределения эндогликаназы примерно в 20 раз (от 0,02 до 0,37 г/л) скорость гидролиза соответствующими целлюлозными комплексами возрастает почти в 50 раз в случае кристаллической целлюлозы и всего в 2 раза в случае аморфной (при равной поверхности целлюлозы в единице объема и равных концентрациях адсорбированной эндогликаназы). В случае же растворимой СМ-целлюлозы адсорбционная способность эндогликаназы, естественно, не имеет значения и при равной объемной концентрации эндогликаназы и избытке целлюлозы скорость гидролиза СМ-целлюлозы в пределах $\pm 50\%$ одинакова для всех 12 целлюлозных комплексов (рис. 4).

Таким образом, в настоящей работе показано, что для гидролиза аморфной целлюлозы определяющим является только количество адсорбированного фермента, тогда как для гидролиза кристаллической целлюлозы важно не только его количество, но и главным образом прочность взаимодействия фермента с поверхностью субстрата. Способность кристаллического субстрата к гидролизу при прочном взаимодействии повышается настолько, что составляет примерно 30% реакционной способности аморфной целлюлозы. Напротив, при относительно слабой адсорбции целлюлаз на поверхности кристаллической целлюлозы (даже при достаточно большой поверхностной концентрации ферментов) последняя остается практически полностью инертной по отношению к ферментативному гидролизу.

Это позволяет сделать вывод, что «С₁-фактор» не индивидуальное вещество, не особый фермент, а скорее свойство уже известных ферментов,

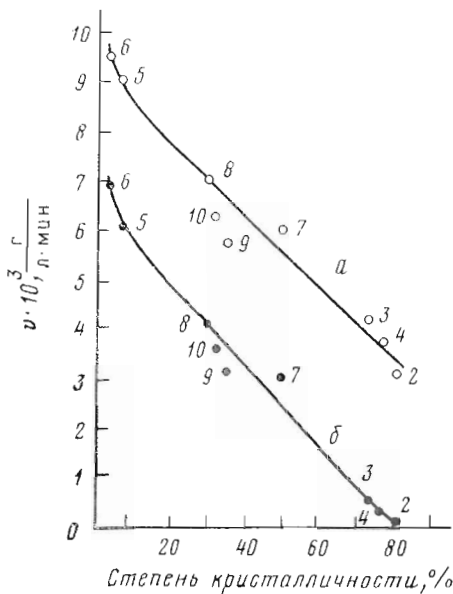


Рис. 2

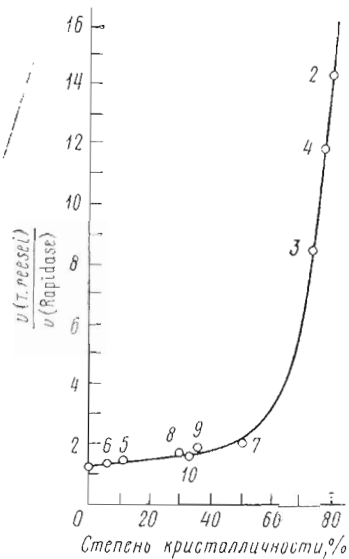


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость стационарной скорости гидролиза целлюлозы (v) от степени ее кристалличности для целлюлаз *T. reesei* (а) и «Rapidase» (б) в условиях избытка целлобиазы. v определяли из кинетических кривых образования глюкозы при равных поверхностных концентрациях адсорбированной эндоглюканазы (12,5 ед. акт./л²). Объемная концентрация эндоглюканазы (ед. акт./л): *T. reesei* — 77, «Rapidase» — 310 (40° С, рН 4,5)

Рис. 3. Зависимость стационарной скорости гидролиза целлюлозы под действием целлюлазы *T. reesei*, отнесенной к стационарной скорости гидролиза той же целлюлозы препаратом «Rapidase» (см. рис. 2), от степени кристалличности целлюлозы. Точка на оси ординат — отношение максимальных скоростей гидролиза растворимой СМ-целлюлозы под действием этих препаратов в условиях избытка целлобиазы при объемной концентрации эндоглюканазы в обоих случаях 50 ед. акт./л (40° С)

которое выражено у них в большей или меньшей степени — способность эндоглюканазы целлюлазного комплекса прочно адсорбироваться на целлюлозе. Мы полагаем, что наряду с высокой каталитической активностью ферментов это свойство является решающим для эффективной деградации целлюлозы.

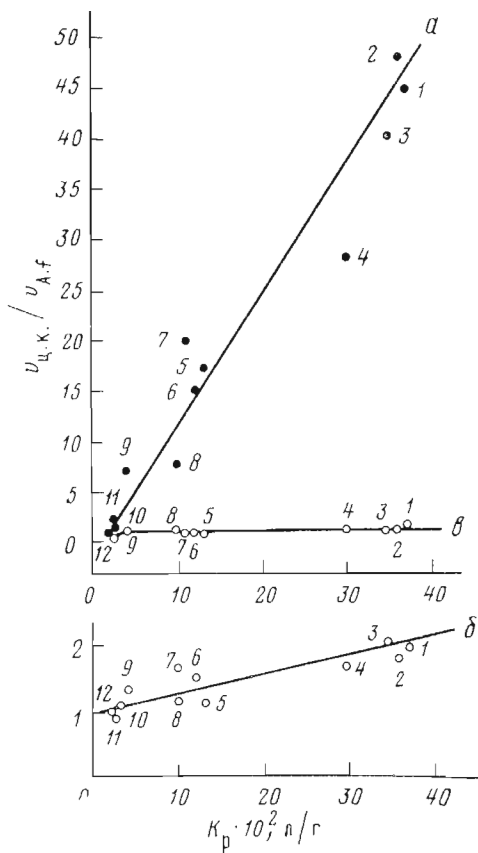
Экспериментальная часть

В работе использованы 12 очищенных целлюлазных препаратов из различных источников. Препараты *T. viride*, *T. longibrachiatum*, *G. candidum*, *T. koningii*, *Asp. foetidus* отечественного производства очищены в лаборатории по получению ферментов для медицинских целей ВНИИБиотехника. Препарат *T. lignorum* очищен на Олайнском заводе химических реактивов. Препарат из *Asp. terreus* получен в Институте микробиологии АН СССР. Целлюлазные комплексы *T. reesei* и *M. verrucaria* предоставлены проф. Э. Ризом (Армейский центр США по исследованиям и разработкам, Нейтик, Массачусетс). Использованы также коммерческие препараты «Rapidase» (Франция) и *T. viride* (Boehringer Mannheim, ФРГ). Активности перечисленных препаратов приведены в табл. 1. Помимо этого в работе использована целлобиаза из *Asp. foetidus*, полученная нами в высокоочищенном состоянии (активность 13 000 ед. акт./г) по методике [13].

В качестве субстратов в настоящей работе использовали натриевую соль СМ-целлюлозы (Sigma, США, medium viscosity, № С-4888), целлобиозу (Sprofa, СССР), микрокристаллическую целлюлозу (Chemapol, СССР) и хлопок (получен из ЦНИИХпром, Ташкент).

Гидроцеллюлозу (образец 2, табл. 2) получали обработкой хлопка 10 н. НСl при 20° С в течение 1 сут и тщательно отмывали на стеклянном фильтре до нейтрального рН промывочных вод.

Рис. 4. Ось ординат — стационарная скорость гидролиза кристаллической (а), аморфной (б) и растворимой (в) целлюлозы под действием целлюлазных комплексов ($v_{ц.к.}$), сорбированная по скорости гидролиза тех же субстратов препаратом *A. foetidus* ($v_{A.f.}$). Ось абсцисс — коэффициент распределения эндоглиуканаз целлюлазных комплексов. а — МКЦ (4 м²/л); концентрация адсорбированной эндоглиуканазы 150 ед.акт./л; скорость гидролиза препаратом *A. foetidus* — $3,3 \cdot 10^{-3}$ г/л·мин; б — аморфная целлюлоза (4 м²/л), концентрации адсорбированной эндоглиуканазы 150 ед.акт./л; скорость гидролиза препаратом *A. foetidus* — $1,2 \cdot 10^{-2}$ г/л·мин; в — растворимая СМ-целлюлоза, 10 г/л; концентрация эндоглиуканазы 50 ед.акт./г, скорость гидролиза под действием препарата *A. foetidus* — $9 \cdot 10^{-3}$ г/л·мин. Во всех случаях — избыток целлюлазы, 40° С, 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 4,5. Нумерация в соответствии с табл. 1



Обработку хлопка и МКЦ с целью удаления легкогидролизуемой части субстрата проводили целлюлазным комплексом «Rapidase» (2 г/л) при 40° С, рН 4,5 в течение 1 сут. Остаток тщательно отмывали водой и кипятили 1 ч для инактивации остатков адсорбированного фермента (образцы 1 и 4, табл. 2).

Обработку МКЦ и молотого хлопка фосфорной кислотой и кадоксеном осуществляли согласно методике [12] (образцы 5, 6, 10).

Измельчение образцов 7–10 проводили на шаровой вибромельнице при частоте 1500 кол./мин в течение 5–15 мин. Описание вибромельницы дано в работе [14].

Все образцы целлюлозы обезвоживали смесью ацетон — этанол (1 : 1) в течение 1 сут при 20° С, тщательно отмывали дистиллированной водой и лиофильно высушивали.

Площадь поверхности, доступную для адсорбции белков, определяли по величине максимальной адсорбции эндоглиуканазы *T. longibrachiatum* согласно методике [12].

Степень кристалличности целлюлозы определяли методом рентгеновской дифрактометрии на установке УРС-50И [12]. Образцы целлюлозы предварительно увлажняли и высушивали на воздухе.

Степень полимеризации целлюлозы находили, определяя вязкость ее растворов в кадоксене [12].

Определение активности отдельных компонентов целлюлазного комплекса (в международных единицах), а также методы регистрации образующихся в ходе реакции глюкозы и восстанавливающих сахаров подробно описаны в работе [15].

За меру адсорбционной способности эндоглиуканазы принимали коэффициент равновесного распределения фермента между раствором и поверхностью (K_p), равный отношению количества фермента, адсорбированного единицей поверхности (или массы, если удельная поверхность постоянна) адсорбента, к концентрации фермента в растворе.

K_p определяли в термостатируемых стеклянных центрифужных пробирках, снабженных магнитной мешалкой. В пробирку вносили навеску целлюлозы, добавляли 5 мл 0,1 М натрий-ацетатного буфера (рН 4,5) и перемешивали 1 ч. Затем вносили 5 мл раствора фермента с определенной активностью и перемешивали 10 мин (адсорбционное равновесие в этих условиях достигается за 1–3 мин). Целлюлозу отделяли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин при фиксированной температуре и определяли остаточную активность в супернатанте. По разнице определяли количество адсорбированного фермента.

Расчет количества равновесно адсорбированного фермента при проведении кинетических экспериментов для случая малого заполнения поверхности проводили по формуле

$$[E]_{\text{адс}} = [E]_0 \frac{K_p [S]}{1 + K_p [S]}, \text{ ед. акт./мл,}$$

где $[E]_{\text{адс}}$ — объемная концентрация адсорбированной эндоглюканазы; $[E]_0$ — исходная концентрация эндоглюканазы в растворе; $[S]$ — концентрация целлюлозы (г/л или $\text{м}^2/\text{л}$); K_p — коэффициент распределения (л/г или л/м^2).

Изучение кинетики ферментативного гидролиза нерастворимой целлюлозы проводили в термостатируемых при 40°С ячееках объемом 20 мл, снабженных магнитной мешалкой. В ячейку с 0,1 М натрий-ацетатным буфером вносили навеску целлюлозы и суспендировали перемешиванием. Через 1 ч вносили раствор целлобиазы (концентрация целлобиазы была подобрана таким образом, чтобы единственным растворимым продуктом гидролиза была глюкоза) и раствор фермента с определенной активностью эндоглюканазы. Затем с интервалом в 10–30 мин отбирали пробы, отделяли от целлюлозы и анализировали на содержание глюкозы.

Изучение гидролиза 1% раствора СМ-целлюлозы (для всех использованных в работе препаратов это величина $\gg K_m$) проводили в условиях избытка целлобиазы, регистрируя скорость накопления глюкозы [15].

Вклад экзоглюкозидазы целлюлазных комплексов в скорость накопления глюкозы при гидролизе растворимой СМ-целлюлозы и нерастворимых субстратов изучали при добавлении в реакционную смесь вместо целлобиазы глюконо- δ -лактона в концентрации, необходимой для полного ингибирования целлобиазы (10^{-2} – 10^{-3} М) [16]. Для всех использованных в работе препаратов вклад экзоглюкозидазы, вносимый ею в скорость накопления глюкозы в условиях избытка целлобиазы, не превышал 12–15% при гидролизе СМ-целлюлозы, 5–7% при гидролизе аморфной целлюлозы и 2–3% при гидролизе кристаллической целлюлозы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березин И. В., Клесов А. А. Наука в СССР, 1981, № 3, с. 6–15.
2. Клесов А. А., Рабинович М. Л. В кн.: Инженерная энзимология и биоорганический катализ/Ред. Кретович В. Л., Березин И. В. Итоги науки и техники. Сер. Биол. химия, т. 12. М.: ВИНТИ, 1978, с. 49–91.
3. Родионова Н. А. В кн.: Целлюлазы микроорганизмов/Ред. Кретович В. Л. М.: Наука, 1981, с. 4–40.
4. Reese E. T., Siu R. G., Levinson H. S. J. Bacteriol., 1950, v. 59, p. 485–497.
5. Erikson K.-E. Biotechnol. and Bioeng. Symp., 1978, v. 20, p. 317.
6. Pettersson L. G. In: Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose. Helsinki, 1975, p. 255.
7. Wood T. M., McCrae S. J. Biochem. J., 1978, v. 171, p. 61.
8. Nisizawa K. J. Ferment. Technol., 1973, v. 51, p. 267.
9. Рабинович М. Л., Клесов А. А., Черноглазов В. М., Нгуен Ван Вьет, Березин И. В. Докл. АН СССР, 1981, т. 260, № 6, с. 1481–1486.
10. Fan L. T., Lee Y.-H., Beardmore D. H. Biotechnol. and Bioeng., 1980, v. 22, № 1, p. 177–199.
11. Sasaki T., Tanaka T., Nanbu N., Sato Y., Kainuma K. Biotechnol. and Bioeng., 1979, v. 21, p. 1031–1042.
12. Клесов А. А., Силицын А. П. Биоорганич. химия, 1981, т. 7, № 12, с. 1801–1812.
13. Чурилова П. В., Максимов В. И., Клесов А. А. Биохимия, 1980, т. 45, вып. 4, с. 669–678.
14. Силицын А. П., Агафонов М. Н., Хасанов Х. Х., Рахимов М. М., Клесов А. А. Прикл. биохим. и микробиол., 1980, т. 16, вып. 1, с. 29–39.

15. Клесов А. А., Рабинович М. Л., Синицын А. П., Чурилова И. В., Григораш С. Ю. Биорган. химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1225-1242.
16. Синицын А. П., Клесов А. А. Биохимия, 1981, т. 46, вып. 2, с. 202-212.

Поступила в редакцию
10.XI.1981

THE ROLE OF ENDOGLUCANASE ADSORPTIVITY IN DEGRADATION OF CRYSTALLINE OR AMORPHOUS CELLULOSE

KLYOSOV A. A., CHERNOGLAZOV V. M., RABINOWITCH M. L.,
SINITSYN A. P.

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

The role of adsorption of endoglucanases from 12 cellulase complexes has been examined in the hydrolysis of various celluloses. Using 10 cellulose materials differing in physico-chemical properties (specific surface area, crystallinity, or polymerization degree), the efficacy of the amorphous cellulose hydrolysis was shown to depend only on the amount of the enzyme it adsorbs, whereas for hydrolysis of a crystalline cellulose the main factor is the binding «performance» characterized by the adsorption equilibrium constant. For crystalline cellulose tightly bound to the enzyme, the reactivity is enhanced as much as reaching about 30% of the activity of the amorphous cellulose. On the other hand, if crystalline cellulose binds the endoglucanase relatively loosely, it remains virtually resistant to the hydrolysis.