

ENZYMY BIORĄCE UDZIAŁ W HYDROLIZIE CELULOZY

Stefan Russel¹, Ewa B. Górską¹, Andrzej I. Wyczółkowski²

¹Katedra Nauk o Środowisku Glebowym SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa
e-mail: e.b.gorska@wp.pl

²Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4, 20-270 Lublin 27

Streszczenie. Rozkład celulozy jako głównego składnika tkanki resztek roślinnych wzbogaca glebę w polisacharydy, które są wykorzystywane przez edafon gleby jako podstawowe źródło węgla w tym środowisku. Za rozkład ten są odpowiedzialne drobnoustroje celulolityczne, produkujące enzymy kompleksu celulaz. Przedstawiono metody oznaczania aktywności enzymów grupy celulaz stosowane do badań w środowisku gleby.

Słowa kluczowe: gleba, całkowita aktywność celulolityczna, sacharaza

Każdego roku do środowiska naturalnego wraz z obumarłymi tkankami roślinnymi trafiają duże ilości polisacharydów nie rozpuszczalnych i rozpuszczalnych w wodzie między innymi: celuloza, skrobia, sacharoza i inne. Węgiel zmagazynowany w tych związkach chemicznych może trafić ponownie do „obiegu węgla w przyrodzie” w wyniku enzymatycznego rozkładu tych związków przez wyspecjalizowane grupy fizjologiczne mikroorganizmów celulolitycznych, amylolitycznych i innych.

Celuloza zbudowana jest z łańcuchów utworzonych z jednostek β -D-glukozy połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Podstawową jednostką powtarzającą się w łańcuchu celulozy jest dwucukier celobioza [1,4]. Łańcuchy celulozy połączone są między sobą wiązaniami wodorowymi i siłami Van der Waalsa, tworząc elementarną fibryllę. Celuloza zawiera dwa rodzaje regionów, jedne w których łańcuchy celulozy ułożone są równolegle tworząc strukturę krystaliczną i drugie regiony amorficzne, gdzie łańcuchy są rozmieszczone nieregularnie. Stopień krystaliczności celulozy zależy od pochodzenia celulozy i źródła jej pozyskiwania [14]. Wskaźnik krystaliczności celulozy kształtuje się od 0% dla

amorficznej celulozy i acid-swollen cellulose do prawie 100% dla celulozy naturalnej otrzymanej z komórek glonu *Valonia macrophysa*.

Rapa i Beermann [10] wykazali, że za mineralizację celulozy odpowiedzialne są tzw. drobnoustroje celulolityczne, które produkują kompleks celulazy. Kompleks enzymów hydrolizujących celulozę złożony jest z trzech enzymów: celulazy (endo- β -1,4-glukanazy) (EC 3.2.1.4), która hydrolizuje wiązania β -1,4-glikozydowe w łańcuchu celulozy, egzo- β -1,4-glukanazy (EC 3.2.1.91, EC 3.2.1.74) odszczepiające jednostki celobiozy lub glukozy od nieredukujących końców celulozy, β -glukozydaza (celobiasa) (EC 3.2.1.21), która katalizuje reakcję rozkładu celobiozy do dwóch cząsteczek glukozy i odszczepia cząsteczki glukozy od nieredukujących końców celooligosacharydów.

Proces celulolizy można oszacować za pomocą różnych metod między innymi metodą kolorymetryczną przez pomiar ilości cukrów redukujących w przeliczeniu na glukozę [13] uwolnionych z zastosowanego do analizy enzymatycznej substratu jakim może być: karboksymetyloceluloza, bibuła filtracyjna Whatman Nr 1, celuloza mikrokryształiczna Avicel lub włókna bawełny. Dla dokładniejszego zbadania procesu celulolizy możemy zastosować mikroskopię elektronową, dzięki której można zlokalizować miejsca adsorpcji celulaz do substratu [2], erozję [3] i zmiany strukturalne włókien celulozy [11].

Całkowita aktywność celulolityczna (FP-aza enzymy scukrzające celulozę)

Do oznaczania aktywności FP-azy w glebie najczęściej stosuje się metody wagowe, polegające na zakopywaniu w glebie tkanin lnianych, bibuły filtracyjnej Whatman Nr 2 oraz innych materiałów celulozowych o różnym stopniu krystaliczności i po określonym czasie oznaczaniu ubytków wagowych [7,9,12]. Metoda ta może posłużyć do izolacji z badanej gleby wybranych grup systematycznych mikroorganizmów zdolnych do mineralizacji celulozy. Stopień rozkładu wprowadzonej do gleby celulozy można oznaczyć metodami chemicznymi. Niektórzy badacze jako wskaźnik aktywności celulolitycznej przyjmują intensywność wydzielania dwutlenku węgla z gleby wzbogaconej w celulozę.

Metoda wagowa

Odczynniki

1. 0,02 M NaOH,
2. 0,2 M HCl.

Wykonanie oznaczenia

Krażki bibuły Whatman Nr 2 (zważone, ponumerowane, opakowane w siatkę stylonową ułatwiającą wyjmowanie nadtrawionych krążków bibuły z gleby i zabezpieczającą je przed przyklejaniem się grudek gleby do substratu celulozowego) zakopać w glebie na głębokości 10 cm. Po 1,3 i 5 tygodniach krążki wyjmować z gleby i wagowo oznaczać stopień rozkładu. Nie rozłożone resztki bibuły wyjąć z siatki, oczyścić delikatnie z gleby i gotować w 0,02 M NaOH przez 20 minut. Po osadzeniu się na dnie zlewki resztek bibuły, odciągnąć płyn z nad osadu za pomocą pompy wodnej zakończonej lejkiem obszytym gazą młyńską (zatrzymuje rozklejone włókna celulozy). Po przepłukaniu bibuły gorącą wodą destylowaną, bibułę gotować ponownie w 0,2 M HCl przez 15 do 20 minut. Resztki bibuły przenieść ilościowo na uprzednio zważony sączonek i przemyć gorącą wodą destylowaną aż do zaniku reakcji na chlor. Sączonek z resztkami celulozy wysuszyć w temperaturze pokojowej i zważyć. Wynik obliczyć wg wzoru:

$$K = 100 \cdot (A-B)/A \quad \% \quad (1)$$

gdzie: K – % rozłożonej celulozy, A – masa sączoneka przed wkopaniem do gleby, B – masa sączoneka po wyjęciu z gleby i potraktowaniu kwasem oraz ługiem.

Metoda: Petkova Markova [8]

Zasada oznaczenia

Metoda ta polega na utlenieniu nierozłożonej w glebie celulozy mieszaniną dwuchromianu potasu i stężonego kwasu siarkowego. Zredukowane jony Cr^{3+} oznacza się kolorymetrycznie.

Odczynniki

1. Roztwór dwuchromianu potasu (0,5M): 100 g sproszkowanego $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ rozpuszcza się w 1 dm³ wody destylowanej i sączonek się,
2. H_2SO_4 c.wł. 1,84,
3. Roztwór soli Mohra 0,25M: 90,04 g $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ w 1 dm wody (przechowywać w zakorkowanej, ciemnej butelce),
4. Sproszkowana celuloza Whatman CF 12.

Wykonanie oznaczenia

Odważyć dwie 500g naważki gleby. Do jednej z nich dodać 1 lub 2% proszku celulozowego. Obie próbki nasycić wodą destylowaną do 65% ogólnej pojemności wodnej i umieścić w doniczkach. Inkubować w stałej temperaturze np. 28°C. Ilość gleby oraz % dodawanej celulozy, wilgotność gleby, czas inkubacji można zmieniać w zależności od warunków doświadczenia. Po doprowadzeniu gleby do odpowiedniej wilgotności należy oznaczyć ciężar gleby wraz z doniczką. W odstępach 24 godzinnych kontrolować wagowo poziom wilgotności gleby w naczyniach. Po inkubacji z każdej doniczki pobrać po 20 g próbki, wysuszyć je do stałej wagi w temperaturze pokojowej. Następnie próbki utrzeć w moździerzu i przesiać przez sito o średnicy oczek 0,25 mm.

Pobraną z przesianej gleby 1g próbkę przenieść do kolby Erlenmayera na 300 cm³. Następnie dodać 20 cm³ 0,5M roztworu dwuchromianu potasu i 15 cm³ stężonego H₂SO₄, w kolbie umieścić mały lejek służący jako chłodnica zwrotna. Zawartość kolby ostrożnie wymieszać i doprowadzić do wrzenia (w celu zapewnienia równomiernego wrzenia na dno kolby wrzucić szczyptę wyżarzonego pumeksu lub porcelany). Od momentu zagotowania ogrzewać przez 5 minut. Następnie kolbę wystudzić, obmyć lejek z zewnątrz i wewnątrz wodą destylowaną. Całość przenieść do kolby miarowej o pojemności 200 cm³ i uzupełnić do kreski wodą destylowaną. Po 24 godzinach zmierzyć intensywność zabarwienia roztworu kolorymetrycznie przy długości fali $\lambda = 590$ nm. Wyniki odczytać z krzywej wzorcowej.

Krzywa wzorcową i obliczenie

Do 9 kolb stożkowych o pojemności 300 cm³ dodać po 20 cm³ roztworu dwuchromianu potasu i 15 cm³ kwasu siarkowego. Mieszaninę ogrzewać przez 5 minut j/w. Po oziębieniu, do poszczególnych kolb przenieść kolejno odpowiednio: 0; 1; 2,5; 5; 10; 15; 20; 25 i 30 cm³ 0,25M roztworu soli Mohra. Następnie zawartość kolb przenieść ilościowo do kolb miarowych o pojemności 200 cm³ i uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Ekstynkację barwnych roztworów zmierzyć kolorymetrycznie przy długości fali $\lambda = 590$ nm. Wartość ekstynkacji otrzymaną w czasie wykonywania próby pełnej porównać z krzywą wzorcową, odczytując odpowiadającą tej wartości ilość cm³ soli Mohra. Przyjmuje się, że 1 cm³ 0,5M roztworu soli Mohra odpowiada 0,0015 g węgla.

Znając tę wartość obliczyć % węgla w badanej próbce gleby:

$$\% C = a \cdot K \cdot 100 / h \quad (2)$$

gdzie: a – cm³ soli Mohra (wartość odczytana z wzorca), K – współczynnik przeliczeniowy na węgiel dla 0,5 M roztworu soli Mohra, h – naważka gleby (g).

Aktywność celulolityczną wyrażać w % węgla wydzielonego z gleby w postaci CO_2 , po wzbogaceniu jej w celulozę:

$$A = B - C \quad (3)$$

gdzie: A – % C wydzielonego z gleby w postaci CO_2 , B – % C w glebie z celulozą w czasie 0, C – % C w glebie z celulożą w czasie np. 7 dni.

Endo- β -1,4-glukanaza EC 3.2.1.4

Zasada oznaczenia

Metoda oparta jest na pomiarze spadku lepkości roztworu metylocelulozy po jej hydrolizie przez endo- β -1,4-glukanazę.

Odczynniki

1. 0,9 % roztwór metylocelulozy (MC) w buforze McIlvaina (pH 5,5),
2. bufor McIlvaina: roztwór „a” – 71,69 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ rozpuścić w 1000 cm^3 wody destylowanej; roztwór „b” – 21,01 g kwasu cytrynowego rozpuścić w 1000 cm^3 wody destylowanej. Przed użyciem mieszać 267 cm^3 roztworu „a” z 233 cm^3 roztworu „b”,
3. Toluen.

Wykonanie oznaczenia

Do 40 cm^3 0,9% roztworu metylocelulozy dodać kilka kropli toluenu i 1g gleby przesianej przez sito o średnicy oczek 1 mm. Całość inkubować przez 5-7 dni w temperaturze 28°C , następnie zawartość kolby przesączyć przez podwójną gazę. Lepkość przesączu zmierzyć na wiskozymetrze Vogel-Osaga lub Oswalda w temperaturze 30°C .

Próbę kontrolną nastawić z gleby wyjałowionej w autoklawie.

Obliczenie

Aktywność endo- β -1,4-glukanazy podawać w % spadku lepkości roztworu MC wyliczonych ze wzoru:

$$A \% = (T_k - T_p) / T_k \cdot 100 \% \quad (4)$$

gdzie: T_k – czas przepływu roztworu kontrolnego w kapilarze wiskozymetru,
 T_p – czas przepływu roztworu badanego w kapilarze wiskozymetru.

Uwaga do metody

Budowa wiskozymetru Oswalda, jego obsługa i postępowanie w czasie oznaczania lepkości zawarte są np. w „Ćwiczenia laboratoryjne z chemii fizycznej”. Wyd. Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin 2004.

Beta – fruktofuranazydaza (Sacharaza, inwertaza) EC 3.2.1.26

Sacharaza katalizuje hydrolizę wszystkich oligosacharydów zawierających resztę β -D-fruktofuranozy, takich jak sacharoza, rafinoza i inne. Działanie tego enzymu polega na odszczepieniu wolnej fruktozy, dlatego w wyniku hydrolizy np. sacharozy powstające produkty to: D-fruktoza i D-glukoza. Metody oparte są na oznaczeniu cukrów redukujących powstałych po enzymatycznej hydrolizie sacharozy.

Metoda: Hoffmanna i Pallaufa [6]

Zasada oznaczenia

Metoda oparta jest na oznaczeniu cukrów redukujących metodą Samogyi i Nelsona powstałych po enzymatycznej hydrolizie sacharozy. W metodzie tej jon Cu^{+2} redukowany jest przez cukry redukujące do jonu Cu^{+} , który z kolei redukuje kwas arsenomolibdenowy. W wyniku reakcji powstaje niebieskie tlenki molibdenu (Mo_2O_5 i MoO_3). Natężenie niebieskiego zabarwienia, które jest proporcjonalne do stężenia cukrów redukujących, mierzy się kolorymetrycznie. Czułość metody od 10-100 μg cukrów redukujących.

Odczynniki

1. Roztwór substratu 20%: 20g sacharozy cz.d.a. rozpuścić w 100 cm^3 wody destylowanej,
2. Bufor octanowy $\text{pH} = 5,5$: „a” – 120 cm^3 lodowatego kwasu octowego przenieść do kolby miarowej o pojemności 1000 cm^3 i uzupełnić do kreski wodą destylowaną, „b” – 164 g bezwodnego octanu sodu rozpuścić w 1000 cm^3 wody destylowanej. Przed użyciem roztwór „a” zmieszać z „b” w stosunku 1:8,
3. Roztwór Fehlinga – „a” 150 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ rozpuścić w 500 cm^3 wody destylowanej, „b” – 25g Na_2CO_3 (bezwodny) i 25 g winianu sodowo-potasowego rozpuścić w 1000 cm^3 wody destylowanej. Przed użyciem roztwory zmieszać w stosunku 1:25,
4. 0,5 molowy roztwór fosforanu dwusodowego – 17,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ rozpuścić w 1000 cm^3 wody destylowanej,

5. odczynnik molibdenowy – „a” – 5% roztwór molibdenianu heptaamonowego, „b” – 200 cm³ stężonego kwasu siarkowego rozpuścić w 1000 cm³ wody destylowanej. Przed użyciem roztwory zmieszać w stosunku 1:1,
6. roztwór wzorcowy – 100 mg glukozy i 100 mg fruktozy rozpuścić w 200 cm³ wody destylowanej.

Wykonanie oznaczenia

Do 10 g gleby powietrznie suchej i przesianej przez sito o średnicy oczek 2 mm, przeniesionej do kolby miarowej o pojemności 100 cm³ dodać 2 cm³ toluenu. Całość dokładnie wymieszać. Po 15 minutach dodać 10 cm³ 20% roztworu sacharozy i 10 cm³ buforu octanowego o pH 5,5. Całość po ponownym wymieszaniu umieścić w temperaturze 37°C na okres 3 godzin. Po inkubacji kolby dopełnić wodą destylowaną do kreski. Zawartość kolbki dokładnie wymieszać i przesączyć przez sącze z bibuły twardej. Przesączyć zebrać do 100 cm³ kolby stożkowej.

Następnie 5 cm³ przesączu przenieść do kolby miarowej o pojemności 100 cm³ zawierającej 4 cm³ płynu Fehlinga. Kolbę wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 25 minut, po czym szybko ochłodzić pod bieżącą wodą i dodać 2 cm³ 0,5 molowego roztworu Na₂HPO₄ oraz 5 cm³ mieszaniny molibdenianu heptaamonowego i kwasu siarkowego. Zawartość wymieszać i pozostawić na 1 godzinę w ciemni. Następnie kolbę ponownie dopełnić do kreski wodą destylowaną, wymieszać i oznaczyć intensywność zabarwienia w kolorymetrze przy długości fali $\lambda = 582$ nm w stosunku do wody destylowanej jako kontroli.

Równocześnie przygotować próbę ślepą (10g gleby + 2cm³ toluenu + 10cm³ wody destylowanej). Próbę ślepą należy traktować odczynnikami analogicznie jak próbę badaną. Zawartość cukrów redukujących w próbce pełnej i ślepej odczytać z krzywej wzorcowej.

Krzywej wzorcowej

Z roztworu wzorcowego glukozy i fruktozy odmierzyć kolejno 0, 1, 2, 3...25 cm³ do kolb miarowych o pojemności 100 cm³. Następnie dodać po 10 cm³ buforu i dopełnić kolby do kreski wodą destylowaną. Po dokładnym wymieszaniu, pobrać po 5 cm³ odpowiednich roztworów standardowych i przenieść do kolb miarowych na 100 cm³. Dalej postępować jak z przesączem próby badanej.

W układzie prostokątnym, na osi odciętych odłożyć poszczególne, wzrastające wartości stężenia cukru inwertowanego, a na osi rzędnych odpowiadające im wartości ekstynkcji. Z połączenia otrzymanych w ten sposób punktów wykreślić krzywą wzorcową.

Obliczenie

Aktywność sacharazy A wyrażoną w mg cukru inwertowanego wyliczamy z następującego wzoru:

$$A = (P - P_{\text{śl}}) \cdot 20 \quad (5)$$

gdzie: P – mg cukru inwertowanego w próbie pełnej, $P_{\text{śl}}$ – mg cukru inwertowanego w próbie ślepej, 20 – mnożnik przeliczeniowy na 10 g gleby (w próbie oznaczanej po kolejnych rozcieńczeniach znajdowało się 0,5 g gleby w 100 cm³).

Metoda: Frankenberger, Johanson [5]

Oznaczenie cukrów redukujących kwasem dwunitrosalicylowym.

Odczynniki

1. Toluen cz.d.a.,
2. Bufor octanowy pH = 5,5: jak w poprzedniej metodzie,
3. Roztwór substratu 10%: rozpuścić 10 g sacharozy cz.d.a. w buforze octanowym w kolbie miarowej o pojemności 100 cm³,
4. Roztwór NaOH (2M): 8 g NaOH cz.d.a. rozpuścić w 50 cm³ wody destylowanej. Po ostygnięciu dopełnić wodą do objętości 100 cm³,
5. Roztwór barwiący: rozpuścić kolejno 0,2 g kwasu 3,2-dinitrosalicylowego cz.d.a., 0,025 g węgla sodu bezwodnego cz.d.a., 0,005 g EDTA w 40 cm³ wody destylowanej w kolbie miarowej, po rozpuszczeniu dopełnić do 50 cm³,
6. Roztwór wzorcowy: jak w poprzedniej metodzie.

Wykonanie oznaczenia:

Do kolbki stożkowej o pojemności 50 cm³ wprowadzić 3 g gleby przesianej przez sito o średnicy oczek 2 mm dodać 0,2 cm³ toluenu, 5 cm³ buforu octanowego dokładnie wymieszać. Wprowadzić 5 cm³ roztworu sacharozy i ponownie wymieszać, kolbkę zatkać korkiem z waty. Wstawić do ciepłarki o temperaturze 37°C na okres 24 godzin. Po inkubacji dodać 20 cm³ wody destylowanej podgrzanej do temperatury 40°C. Zawartość kolbki wymieszać i sączyć przez sączek z bibuły twardej. Z klarownego przesączu pobrać 1 cm³ i wprowadzić do próbówki z oznaczoną objętością 25 cm³. Dodać 5 cm³ wody destylowanej i 2 cm³ roztworu NaOH oraz 2 cm³ roztworu barwiącego. Probówki z zawartością wstawić na 5 minut do wrzącej łaźni wodnej, a następnie szybko schłodzić do temperatury pokojowej. Dodać wody destylowanej do zaznaczonej objętości próbówki. Oznaczyć intensywność zabarwienia w fotokolorymetrze przy długości fali 540 nm.

Próba kontrolna (ślepa) 3 g gleby, pozostałe odczynniki i w miejsce roztworu sacharozy dodać 5 cm³ wody destylowanej, dalsze postępowanie jak z próbą badaną.

Zawartość cukrów redukujących w próbie badanej i kontrolnej odczytać z krzywej wzorcowej.

Krzywa wzorcowa

Z roztworu wzorcowego odmierzyć 0, 1, 2, 3 ... 25 cm³ do kolbek miarowych o pojemności 100 cm³, dodać 5 cm³ buforu octanowego i dopełnić kolbki do kreski wodą destylowaną. Po dokładnym wymieszaniu pobrać po 1 cm³ odpowiednich roztworów i przenieść do kolbek miarowych o pojemności 50 cm³. Dalsze postępowanie jak z przesączem próby badanej.

W układzie prostokątnym, na osi odciętych odłożyć poszczególne, wzrastające wartości stężenia cukru inwertowanego, a na osi rzędnych odpowiadające im wartości ekstynkcyj. Z połączenia otrzymanych w ten sposób punktów wykreślić krzywą wzorcową.

Obliczenie

Aktywność sacharazy A wyrażoną w mg cukru inwertowanego wyliczamy z następującego wzoru:

$$A = (P - P_{\text{śl}}) 10 \quad (6)$$

gdzie: P – mg cukru inwertowanego w próbie pełnej, P_{śl} – mg cukru inwertowanego w próbie ślepej, 10 – mnożnik przeliczeniowy na 3 g gleby (w próbie badanej po kolejnych rozcieńczeniach znajdowało się 0,5 g gleby w 100 cm³).

PIŚMIENNICTWO

1. **Beguin P., Aubert J.P.:** The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiol. Rev., 13, 25-58, 1994.
2. **Chanzy H., Hennrissat B., Vuong R.:** Colloidal gold labeling of 1,4---glucan cellobiohydrolase adsorbed on cellulose substrat. FEBS Lett., 172, 193-197, 1984.
3. **Chanzy H., Henrissat B.:** Unidirectional degradation of Valonia cellulose microcrystals subjected to cellulase action. FEBS Lett., 184, 285-288, 1985.
4. **Cyperowicz A.S.:** Enzymy. WNT, Warszawa, 1974
5. **Frankenberger W.T. jr., Johanson J.B.:** Method of measuring invertase activity in soils. Plant Soil, 74, 301-311, 1983.
6. **Hoffman G., Pallauf J.:** Eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Saccharose-Aktivität von Böden Z.Pflanzerenahr. Dung Bodenkunde, 110, 193-201, 1965.
7. **Kozowa J.:** Mikrobiologische Zellulosezersetzung unter natürlichen Bodenverhältnissen. Zbl. Bakt.Paras. Infektionskr. Hyg., 116, 459, 1963

8. **Petkov P.D., Markova T.Ch.:** A method of studying cellulose decomposition in soil. *Biologie du sol*, 10,17, 1969.
9. **Pokorna-Kozowa J.:** Beim Studium der Aktivitat der zellulolytischen Mikroflora verwendete Methoden. *Tagungsberichte*, 98, 75, 1968.
10. **Rapa P., Beermann A.:** Bacterial cellulase. In: *Biosynthesis and Biodegradation of cellulase*. Haigler C. H., Weimer P. J., New York, 535-599, 1991.
11. **Sprey B., Bochem H.:** PElectron microscopic observations of cellulose microfibril degradation by endocellulase from *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 78, 183-188, 1991
12. **Unger H.:** Zellulosest eine Methode zur Ermittlung der zellulolytischen Aktivitat des Bodens in Feldversuchen. *Z. Pflanzenernahr. Dung. Bodenkunde*, 91, 44, 1960.
13. **Updegraf D. M.:** Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal. Biochem.*, 32, 420-424, 1969.
14. **Wood T.M.:** Preparation of crystalline amorphous and dyed cellulase substrates. *Methods Enzymol.*, 160, 19-25, 1988.

ENZYMES TAKING PART IN HYDROLYSIS OF CELLULOSE

Stefan Russel¹, Ewa B. Górska¹, Andrzej I. Wyczółkowski²

¹Department of Sciences of Soil Environment, Agricultural University in Warszawa
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

²Institute of Agrophysics, Polish Academy of Science, ul. Doświadczalna 4, 20-270 Lublin 27
e-mail: e.b.gorska@wp.pl

Abstract. Decomposition of cellulose as a main ingredient of plant residues enriches the soil in polysaccharides which are the main source of carbon in that environment, utilized by the edaphon. The cellulose microorganisms are responsible for this decomposition, as they produce the enzymes of the cellulase complex. The methods of determination of the activity of the cellulase enzymes used in examining the soil environment are presented.

Key words: Soil, main cellulolytic activity, saccharase