**Целюлолітичні препарати**

Ферментні препарати, які здатні розчеплювати целюлозу, в найближчий час знайдуть широке застосування в найрізноманітніших галузях виробництва. Гідроліз целюлози дає глюкозу, яку можна використовувати для виробництва харчових та кормових білкових препаратів, отримувати з неї спирт для енергетичних цілей,а також вона може стати початковим продуктом для виробництва глюкозо-фруктозних сиропів. Відомі промислові способи гідролізу деревини до глюкози, але вони призводять до часткової деградації глюкози та утворенню небажаних домішок, від яких необхідно звільнятися. Для проведення кислотного гідролізу необхідне дороге, стійке до корозії обладнання. Тому найбільш перспективним являється використання целюлаз для гідролізу целюлозовміснї сировини. Целюлолітичні ферменти з успіхом застосовують в найрізноманітніших виробництвах (спиртова, пивоварна, хлібопекарська та ін.), де сировиною являються рослинні матеріали або відходи переробки рослин. Використання целюлаз підвищують вихід цільового продукту та дозволяє підійти до створення безвідходних технологій. Целюлолітичним ферментам належить велике майбутнє. Але целюлоза – дуже складний субстрат для дії ферментів, і в світі немає поки продуцентів, які б повній мірі задовольняли потреби галузей, що застосовують целюлози.

Джерела отримання целюлолітичних ферментів

Целюлази майже виключно синтезуються тільки мікроорганізмами, а саме анаеробними бактеріями роду *Clostridium*, мікроскопічними грибами та ін.. Целюлоза розщеплюється представниками багатьох родів мікроорганізмів – *Alternaria tenuis, Aspergillus amstelodamy, A. fumigatus, A. oryzae, A. terreus, Cellovibrio gilvus, Cephalosporium sacchariticus, Chaetomium globosum, Fusarium culmorum, F. oxysporum, F. solani, Penicillium notatum, P. variable, Trichoderma koningii, T. viride, Cytophaga* та ін..

Механізм дії та властивості целюлаз

**Субстрат.** Субстратом для целюлаз являються целюлоза або продукт її часткової деградації. Целюлоза являється високо полімерним полісахаридом рослин, що складається з залишків глюкози, з’єднаних між собою β-1,4-глюкозиднимим зв’язками. Целюлоза – лінійний полімер. Більшість залишків глюкози в целюлозі містять три вільних гідроксилу у 2, 3 та 6-го вуглецевих атомів, які є основою для утворення водневих зв’язків та формування міцних волокон. В середньому одна нитка целюлози складається з 6000-12000 глюкозних залишків з молекулярною масою близько 1·106 - 2·106. Об’єднані в групи ниткоподібні молекули целюлози називаються мікрофібрилами. В мікрофібрилі нитки целюлози можуть бути упаковані паралельно, з безліччю водневих та інших зв’язків – це «кристаліти»; ділянки, де нема строгої впорядкованої структури, називають аморфними. Аморфні ділянки целюлози легше піддаються зовнішньому впливу: зі збільшенням кількості таких ділянок росте набруньковуваність целюлози, її атакованість ферментами, падає міцність. Целюлоза є нерозчинним у воді субстратом. Нативна целюлоза, особливо з високим ступенем кристалічності, повільно та погано атакується целюлозами. Тому целюлозу для ферментативного гідролізу треба піддавати попередній обробці. Для цього застосовують подрібнення за допомогою вальцювання матеріалу в різних типах млинів, хімічні способи обробки кислотами та лугами, методи фізичної обробки.

В зв’язку з цим при характеристиці целюлолітичних ферментів слід обов’язково враховувати стан субстрату – целюлози. Розрізняють два види целюлози: нативна – нічим не оброблена целюлоза, яка повністю зберегла початкову будову та структуру мікрофібрил (фільтрувальний папір, бавовна), та так звана модифікована, частково оброблена целюлоза, в якій порушені водневі зв’язки і фібрилярна структура волокна. Є. Т. Ріс в 50-ті роки допустив наявність С1-фактора не гідролітичної природи, який викликає деградацію нативної целюлози і робить її доступною для дії комплекса целюлаз, що був названий Сх- ферментами. Схема такого гідролізу наступна:

В 60-х роках К. Селбі висловив гіпотезу, що С1-фактор – це особлива властивість живої культури мікроорганізму.

Була висунута та експериментально обґрунтована загальна схема ферментативного гідролізу целюлози:

**Механізм дії**. В залежності від фізичного стану вихідного субстрату Gn може бути частково деструктованою нерозчинною целюлозою або розчинними похідними целюлози.

Така схема ферментативного гідролізу целюлози дозволяла описати процес деградації субстрата незалежно від складу та походження полі ферментної целюлозної системи. Більше того, виявилось, що якщо виділити окремі целюлолітичні ферменти із різних целюлозних комплексів, отриманих із різних культур мікроорганізмів, та змішати їх один з одним в різних пропорціях, то в кожному випадку можна передбачити, який вид будуть мати криві накопичення продуктів реакції (А. А. Клесов, 1984). Всі ці дані були отримані на аморфній целюлозі і тому залишалась загадкою природа передгідролітичного С1-фактору, для якого не було місця в запропонованій схемі. Тоді і було висунуто І. В. Березиним та А. А. Клесовим (1981) допущення, що С1-фактор – не індивідуальна речовина, не особливий фермент, а просто властивість вже відомих ферментів. Таке допущення дозволяє пояснити багато що і перш за все те, чому цей загадковий С1-фактор не був виділений на протязі стількох років.

Яка ж ця властивість ферментів? Автори відкриття логічно допустили, а потім і експериментально доказали, що це властивість ферментів адсорбуватися на целюлозі. Субстрат нерозчинний, отже властивість ферменту адсорбуватися на ньому навіть більш важлива, ніж його каталітична активність, так як якщо цієї адсорбції не буде, то й гідролізу субстрату не може бути. Експериментальна перевірка підтвердила це припущення та показала, що целюлазні ферменти із різних мікроорганізмів в сотні і тисячі разів розрізняються за здатністю адсорбуватися на целюлозі та що ця їх здатність корелюється з глибиною гідролізу кристалічної целюлози (рис. 1, 2).

З рисунка 1 видно, що чим вища адсорбційна здатність ферменту, тим інтенсивніше на всіх стадіях процесу він гідролізує нативну целюлозу. Таким чином, поряд з високою каталітичною активністю ферментів ця властивість являється вирішальною для подальшого застосування ферментних препаратів для деградації целюлози.

У відповідності з Номенклатурою ферментів до комплексу целюлаз, що беруть участь в деструкції целюлози, слід віднести:

1. 1,4-β-D-глюкан-4-глюканогідролази;
2. 1,4- β-D-глюканглюкогідролаза;
3. 1,4- β-D-глюканцелобіогідролаза;
4. β-D-глюкозидглюкогідролаза.

Отримання препаратів целюлаз

В промислових цілях використовують порівняно невелику кількість видів мікроорганізмів, в основному, які відносяться до роду *Trichoderma,* рідше – до *Geotrichum*. Відомо, що одним із дуже активним продуцентом целюлаз є мікроскопічний гриб *Trichoderma reesei*, в якого є три варіанта: QM6a, QM6d i QM6c. На основі QM6a зараз отримані багаточисельні мутанти з посиленою продукуючою здатністю по целюлазам. Найкращі із цих мутантів утворюють 15-20 г/л позаклітинного білку, головну частину якого (50-80%) складає целобіогідролаза. Однак дуже велика тривалість культивування, порівняно низька продукуюча здатність більшості грибкових мікроорганізмів створюють необхідність подальших пошуків перспективних продуцентів.

Але не тільки гриби можна розглядати в майбутньому в якості єдиних продуцентів целюлаз. Вчені покладають великі надії і на бактерії, особливо анаеробні, які відносяться до роду *Clostridium*.

**Підбір продуцентів**. Традиційний відбір продуцентів проходить шляхом скринінгу величезної кількості можливих продуцентів на здатність гідролізувати целюлозу а потім оптимізації умов культивування. В результаті за рядом продуцентів целюлаз вдалось отримати надзвичайно високе виділення в зовнішнє середовище целюлаз. Так, для найбільш відомого і широко використовуваного у світі продуцента – *Trichoderma reesei* – концентрація позаклітинних целюлаз досягає 20 г/л при продуктивності біосинтезу до 200 мг/(л·год), що в декілька разів перевищує будь-який інший продуцент. Однак молекулярна активність навіть цього гіперпродуценту, тобто відношення ферментативної активності до маси целюлаз, вкрай низька, і цей показник лімітується природною здатністю ферментів даного продуценту адсорбуватися на субстраті, що поки що не піддається зовнішньому впливу та зміні.

Таким чином, звичайний спосіб відбору активних продуцентів вичерпав себе. В теперішній час найбільш вірогідні два шляхи: це пошук продуцентів шляхом біотехнологічного скринінгу більшої кількості мікроорганізмів з урахуванням термостабільності ферментного комплексу, його адсорбційних здатностей та ступеня інгібування продуктами гідролізу; та другий шлях – конструювання продуцентів з заданими властивостями методами генної інженерії.

Отримання препаратів целюлаз із глибинних культур

**Джерела вуглецю**. Запропоновані найрізноманітніші джерела вуглецю: фільтрувальна папір, лінт, буряковий гніт, целюлоза, целобіоза, бавовна, лактоза, пшеничні висівки та ін..

Ще в 60-х роках у працях М. Мандельса та Є. Т. Ріса для *Trichoderma viride* освідчилось на можливість використання для росту культури до 62 джерел вуглецю. Однак активний біосинтез целюлаз спостерігався тільки на джерелах з целюлозой, целюлозовмісною сировиною та на лактозі.

При вивченні впливу джерел вуглецю на біосинтез целюлаз грибами роду *Trichoderma* Р. В. Феніксова досліджувала лактозу, буряковий гніт, фільтрувальний папір, бавовну та їх різноманітні сполучення. Найкращі результати отримані при наявності в середовищі лактози та бурякового гніту.

**Джерела азоту**. Велике значення має і джерела азоту. При вивченні впливу неорганічних і органічних джерел азоту найкращі результати для більшості продуцентів ферментів отриманв при введенні в склад середовища (NH4)2HPO4, (NH4)2SO4, гідролізатів дріжджів, кукурудзяного екстракту, солодових ростків, соєвого борошна і особливо бавовняного шроту та пшеничних висівок. Ведення органічних джерел азоту особливо сильно виявлялось на біосинтезі целюлаз грибом *T. longibrachiatum*.

**Мінеральні речовини та ПАР**. Продуценти целюлаз досить чутливі до мінерального живлення. Відомо, що для росту мікроорганізмів необхідно наявність середовищі фосфору, сірки, калію, натрію, магнию, а також іонів заліза, марганцю, кальцію та інших металів. Однак не всі іони чинять позитивний вплив на біосинтез целюлаз. Відмічають, що іони Co2+, Li+, Ba+ , Na+, як правило, знижують рівень біосинтезу целюлаз на 25-45%.

Наявні факти, що додавання в середовище поверхнево-активних речовин (ПАР) збільшують продукуючу здатність мікроорганізмів по відношенню позаклітинних целюлаз. Припускається, що ПАР сприяє доступу целобіози до зв’язаної в клітинній мембрані трансферазі, яка обумовлює утворення індуктора, наприклад софорози. Крім цього, введення ПАР, наприклад твинів, сприяє підвищенню клітинної проникності. Вони впливають на транспорт поживних речовин всередину клітини та секрецію з неї, що призводить до збільшення рівня біосинтезу позаклітинних ферментів.

**Умови культивування**. Великий вплив на біосинтез целюлаз чинять умови культивування. Відмінна особливість більшості продуцентів целюлаз – це велика тривалість культивування. Зазвичай максимум активності припадає на 4-8 добу. Аналіз даних показує, що в культуральній рідині за оптимальних умов вирощування може накопичуватися від 2 до 22 од. АФБ/мл та від 200 до 500 од. КМЦ/мл.

**Виділення ферменту**. На основі глибинної культури можна отримати технічні препарати целюлаз та очищені целюлолітичні препарати. Технічні препарати отримують шляхом висушування розпилюванням концентратів культури без відділення твердої фази або випаровування її рідкої фази. Для зниження втрат при сушці в культуральну рідину вводять стабілізатори, частіше за все невелику кількість деяких солей. Комплексні очищені целюлолітичні препарати, наприклад із *Т.* *viride,* можна отримати осадженням органічними розчинниками та висолюванням сульфатом амонію.

Якісний та кількісний склад целюлозних комплексів варіює в широких межах в залежності від способу виділення окремих компонентів.

Для отримання очищених препаратів целюлаз використовують комбінацію найрізноманітніших заходів: осадження та фракціонування органічними розчинниками, солями, хроматографію, електрофорез та ін..

**Афінна хроматографія**. Ще в 1973 році І. Н. Канфером була проведена афінна хроматографія целюлаз, в результаті чого на сефарозі 4В з зв’язаним бензидином в якості носія та δ-глюконолактоном в якості лігінда була виділена целобіоза. Найбільшу цікавість являють собою дослідження по афінній хроматографії целюлаз на мікрокристалічній целюлозі або целюлозі у вигляді подрібненого порошкоподібного фільтрувального паперу. Використання целюлози дозволяє розділити целюлозний комплекс на основі різного ступеня спорідненості компонентів до субстрату.

Афінна хроматографія дозволяє отримувати високо очищені целюлозні комплексні препарати з виходом активності до 50% безпосередньо з фільтрату культуральної рідини.

Для співставлення препаратів, що очищені за допомогою афінної хроматографії, з препаратами, отриманими осадженням етиловим спиртом, була проведена їх гель фільтрація на ультра гелі АсА 54 (рис. 3). На рисунку 3а видно, що препарат з індексом Г10Х містить значну кількість баластного білку та пігменту. Препарат, очищений афінною хроматографією (рис. 3б), не містить пігментів і містить тільки дві групи білків, одна із яких (високомолекулярна) не володіє активністю, але доля її не велика.

Таким чином, експерементально показано,що афінною хроматографією на целюлозі можна селективно виділити із неочищених препаратів і культуральної рідини целюлози при незначній кількості супутніх неактивних білків. Можна з достатньою впевненістю сказать, що цей спосіб очистки досить перспективний та рентабельний.