

УДК: 577.152.32

ЦЕЛЮЛОЗОДЕГРАДУЮЧІ СИСТЕМИ МІКРООРГАНІЗМІВ: БІОСИНТЕЗ, ВЛАСТИВОСТІ ТА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ

БОРЗОВА Н. В., ВАРБАНЕЦЬ Л. Д.

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Огляд присвячено ензиматичним системам мікроорганізмів, що забезпечують біодеградацію целюлози. Розглядаються питання класифікації ендо-, екзоглюканази та β -глюкозидази, регуляції їх біосинтезу в мікробній клітині, загальних властивостей та умов виділення й очищення. Особливу увагу приділено порівнянню целюлозодеградуєчих систем аеробних та анаеробних мікроорганізмів, їхнім структурним та функціональним особливостям. Наведено дані щодо сучасних уявлень про механізми біодеградації целюлози.

Ключові слова: целюлази, деградація целюлози, властивості, структура та функції целюлаз, механізм дії.

Діяльність цивілізованого суспільства призводить до накопичення відходів, зокрема целюлозовмісних матеріалів, частка яких у промислових та комунальних відходах постійно зростає і на сьогодні в розвинутих країнах досягає 50% від загальної кількості [1]. Проблема їх утилізації посідає провідне місце в галузі екології та охорони довкілля. Біотехнологічні методи перероблення й утилізації відходів, які містять лігноцелюлозу, є найбільш прийнятними з екологічних та економічних міркувань. Для цього потрібно оцінити здатність різних мікроорганізмів до деградації природних рослинних матеріалів. Умовно деградація лігноцелюлозних субстратів можна розділити на три стадії: 1) утилізація легкозасвоюваних речовин (вуглеводів тощо); 2) розклад целюлози; 3) деструкція лігніну.

Біодеградацію целюлози — найбільш поширеного на землі біополімера, якому належить центральне місце в кругообігу органічного вуглецю, здійснюють целюлази. Природними продуцентами целюлаз є багато організмів як прокариотичного, так й еукаріотичного походження. Основними мікроорганізмами, що продукують целюлази, є гриби, збудники м'якої та бурої гнилі, а також різні види аеробних і анаеробних бактерій. До ензимів целюлазного комплексу належать ендо-1,4- β -глюканази (ЕС 3.2.1.4), екзоце-

лобіогідролази (ЕС 3.2.1.91), а також β -глюкозидази (ЕС 3.2.1.21) та ендо- β -1,4-глюканази, екзоцеллобіогідролази (ЕС 3.2.1.91). Целюлолітичні системи, склад і активність їхніх окремих компонентів, що продукуються різними мікроорганізмами, варіюють у досить широких межах. На цей час найперспективнішими продуцентами целюлаз з погляду промислового використання є гриби таких родів: *Aspergillus*, *Coriolus*, *Eupenicillium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Physarium*, *Sporotrichum*, *Trichoderma*, *Verticillium* та ін. Серед грибів, здатних розщеплювати кристалічну целюлозу, тільки деякі продукують повні позаклітинні целюлолітичні системи (ендо-, екзоглюканази та β -глюкозидази), серед них — *Trichoderma viride*, *T. reesei*, *T. koningii*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium solani*. Для культуральної рідини більшості інших грибів характерна відсутність екзоглюканази, тобто ці гриби можуть деградувати тільки аморфні форми целюлози.

Розповсюдження целюлозолітичних ензимів у природі

Природні продуценти целюлаз є серед багатьох організмів як прокариотичного, так і еукаріотичного походження. Ендо- β -1,4-глюканази ряду бактерій та грибів поряд з іншими гідролітичними ензимами в основному

беруть участь у деградації природної целюлози. Виділяють особливий клас організмів — бактеріальних та грибних фітопатогенів, які реалізують свою целюлазну активність на перших етапах атаки рослин шляхом гідролізу рослинної клітинної стінки [2]. Функції целюлаз у рослині значно ширші та складніші, ніж просто деградація целюлози. У рослинах активація ендо- β -1,4-глюканаз відбувається на різних етапах росту та розвитку, однак механізми участі целюлаз у життєдіяльності рослин до кінця ще не з'ясовано.

Целюлозолітичні ензими продукуються багатьма бактеріями та грибами — аеробними й анаеробними, мезо- та термофільними [3, 4]. Проте, лише незначна кількість грибів і бактерій синтезують високі рівні позаклітинної целюлази, яка здатна до гідролізу кристалічної целюлози [5, 6]. На цей час найбільш дослідженими є целюлазні системи аеробних грибів *T. viride*, *T. reesei*, *P. pinophilum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *F. solani*, *Talaromyces emersonii* і *T. koningii* [7]. Нещодавно було виділено інші мікроорганізми, зокрема теплолюбні аеробні гриби (*Sporotrichum thermophile*, *Thermoascus aurantiacus*, *Chaetomium thermophile*, *Humicola insolens*), мезофільні анаеробні гриби (*Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis*, *Sphaeromonas communis*), мезо- і термофільні аеробні бактерії (*Cellulomonas* sp., *Cellvibrio* sp., *Microbispora bispora* і *Thermomonospora* sp.), анаеробні бактерії (*Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* і *Clostridium thermocellum*), актиноміцети (*Thermomonospora fusca*), які також здатні активно продукувати целюлази [7]. Серед перелічених мікроорганізмів особливий інтерес становлять термофільні продуценти через їхню здатність синтезувати термостійкі ензими, які загалом стійкі до впливу жорстких умов середовища, зокрема кислих і лужних значень рН і температури до 90 °С. Відомими термофільними целюлозолітичними мікроорганізмами є *C. thermocellum*, *T. fusca*, *T. auarantiacus*, *S. thermophile*, *H. insolens* і *C. thermophile* [8–10]. Цим мікроорганізмам також притаманна здатність до гідролізу низки субстратів з мінімальним ризиком забруднення патогенною мікрофлорою.

Визначення целюлазної активності

Різномірність целюлозних субстратів разом зі складністю целюлозолітичних комп-

лексів, що продукуються різними мікроорганізмами, спонукали до розроблення різних методів визначення целюлолітичної активності. Значні відмінності у природі субстратів, варіації у методах визначення різних целюлазних компонентів та синергізм дії цих компонентів значно ускладнювали порівняння результатів, одержаних у різних лабораторіях. Тому в 1984 р. Комісія IUPAC з біотехнології видала методичні рекомендації щодо стандартів визначення целюлазної активності [11]. Однак запропонований перелік методик не цілком задовольнив ензимологів, оскільки не дозволяв оцінювати всі аспекти специфічності дії целюлаз.

Wood і Bhat [12] провели аналіз методів визначення целюлазної активності, що їх використовують у дослідженні грибних целюлаз, з метою виявлення переваг і недоліків різних методів. Результати їхньої роботи підсумовано в табл. 1.

Індукція та регуляція продукції целюлаз

Целюлази належать до індукцибельних ензимів. Усі вивчені на цей час продуценти дають найвищий рівень активності під час вирощування на целюлозі [6, 13, 14]. Целобіоза, лактоза та софороза також здатні індукувати синтез повних та неповних целюлазних комплексів у деяких мікроорганізмів [15]. Синтетичні речовини, такі як палмітат, ацетатний ефір дисахаридів і трицелобіози також можна використовувати для підвищення синтезу целюлаз [13]. Факт високої індукуючої здатності целюлози є дуже цікавим, оскільки цей субстрат, що не є розчинним, не потрапляє у мікробну клітину, однак регулює та індукуює синтез целюлаз.

На сьогодні відомо, що в клітині присутній незначний конститутивний рівень целюлазної активності, який забезпечує первинний гідроліз целюлози до розчинного вуглеводу [16]. Саме цей вуглевод і є справжнім індуктором, який прямо або опосередковано впливає на ДНК, що спричиняє експресію гена, який кодує синтез целюлаз. Так, було показано [17], що конідіально зв'язана целобіогідролаза *Trichoderma* гідролізує целюлозу з вивільненням целобіози та целобіоно- δ -1,5-лактону, які проникають у міцелій та індукують синтез целюлаз. Разом із цим встановлено, що целобіоза здатна індукувати синтез целюлаз *T. viride* тільки у високій концентрації (1% і більше) або в присутності таких сурфактантів, як наприклад Tween-80 [18]. Також Garcia-Martinez зі співавт. [19]

Таблиця 1. Субстрати та методи визначення целюлазної активності

Ензим	Субстрат	Методи та параметри, за якими оцінюють реакцію
Загальна целюлазна активність	Бавовняне волокно	1. Оцінка залишку целюлози [59] 2. Залишки редукуючих вуглеводів [60] 3. Зменшення маси [61] 4. Зменшення міцності розтягнення [61]
	Фільтрувальний папір Гідроцелюлоза Авіцел та Солка Флок	1. Залишки редукуючих вуглеводів [60, 62]
	Забарвлений Авіцел [58]	1. Залишки забарвлених розчинних фрагментів [12]
Екзо-1,4- β -D-глюканаза (целобіогідролаза, екзоцелюлаза, авіцелаза)	Авіцел Гідроцелюлоза Забарвлений Авіцел [58]	1. Залишки редукуючих вуглеводів [63] 2. Залишки забарвленої целобіози [12]
	Аморфна целюлоза [58]	1. Залишки редукуючих вуглеводів [63]. 2. Зниження мутності [64]
	Заміщені та незаміщені целоолігосахариди	1. Зменшення редукуючої здатності [63] 2. Аналіз за допомогою ВЕРХ [36]
Ендо-1,4- β -D-глюканаза (ендоглюканаза, КМ-целюлаза, ендоцелюлаза)	КМ-целюлоза Гідроксіетил-целюлоза	1. Зменшення редукуючих вуглеводів [63] 2. Зниження в'язкості [12]
	Заміщені та незаміщені целоолігосахариди	1. Зменшення редукуючої здатності [63] 2. Аналіз за допомогою ВЕРХ [36]
	Бавовняне волокно Аморфна целюлоза [58]	1. Зростання лужності [65] 2. Залишки редукуючих вуглеводів [63] 3. Зниження каламутності [64]
β -Глюкозидаза або целобіаза	Целобіоза Целоолігосахариди	1. Залишки глюкози [12] 2. Зменшення редукуючої здатності [63]
	<i>o</i> - або <i>n</i> -нітрофеніл- β -D- глюкозиди	1. Залишки <i>o</i> - або <i>n</i> -нітрофенолу [12]

повідомляють, що целобіоза в концентрації 0,2% індукувала продукцію КМ-целюлази і забезпечувала синтез найвищого рівня целюлаз у присутності 1% целобіози у *C. thermocellum*.

Загальновідомим є факт, що продукти трансглікозилювання целобіози є справжніми індукторами целюлаз у *T. reesei* [13]. Також показано, що софороза (β -1,2-глюкобіоза), яка присутня у зразках глюкози, є ефективним індуктором целюлази у *T. reesei* та інших видів *Trichoderma*, навіть у концентрації 0,3 мг/мл, хоча й не індукує целюлазну активність в інших грибів і мутантного штаму *T. reesei* QM 9414 [20]. Дослідження з використанням інгібіторів синтезу протеїну свідчать, що регуляція утворення целюлазних ензимів відбувається на трансляційному рівні [21].

Катаболітна репресія — інший механізм, який, як відомо, регулює синтез целюлаз у бактеріях та грибах. У даному разі кінцевий продукт гідролізу целюлози, контактуючи з клітинними протеїнами, утворює

комплекс, який взаємодіє зі специфічним геном на рівні транскрипції та пригнічує синтез целюлаз. Вуглецева катаболітна репресія присутня в *E. coli* [22], *S. cerevisiae* [23] і *C. thermocellum* [24]. Проте Canevascini зі співавт. [25] повідомляють, що синтез целюлаз регулюється як на рівні індукції, так і катаболітною репресією у *S. thermophile*. Доказом наявності катаболітної репресії є той факт, що целюлази не утворюються під час вирощування мікроорганізмів на глюкозі, гліцеролі та інших вуглецевих джерелах, які беруть участь у вуглеводному метаболізмі. Однак Messner зі співавт. [26] показали, що введення глюкози у процесі вирощування культури *T. reesei* зменшує на 40% синтез тільки 1,4- β -D-глюкан целобіогідролази I (ЦБГ), а продукування інших целюлозолітичних ензимів триває ще протягом 40 год. Оскільки немає доказів того, що саме глюкоза або якийсь катаболіт фактично регулює транскрипцію целюлазних генів, Kubisek рекомендував використовувати термін «катаболітна репресія» [27]. Було

встановлено, що О-глікозилування целюлаз, яке має місце в ендоплазматичному ретикулумі, може відповідати за секрецію целюлаз у *Trichoderma* [27]. Оскільки відзначається зниження активності доліхолфосфат-манозо-синтетази, ключового ензиму шляху О-глікозилування *T. reesei*, під час вирощування культури на глюкозі, залишається відкритим питання, що регулює глюкоза — синтез чи секрецію целюлаз. У разі *Verticillium albo-atrum* позаклітинна секреція ензиму стимулювалася шляхом лімітування вуглецевого живлення. При цьому зменшення продукції целюлаз відбувалось на фоні високої швидкості росту культури [28]. У *C. thermocellum* швидкий ріст на целобіозі супроводжувався зниженням продукції целюлаз, на відміну від вирощування на кристалічній целюлозі [24]. Однак Bhat зі співавторами [8] не відзначали зменшення швидкості росту, ендоглюканазної або целюлазної активності в разі вирощування *C. thermocellum* на целобіозі.

Було показано, що кінцеві продукти гідролізу кристалічної целюлози можуть виступати інгібіторами синтезу целюлаз у рубцевого гриба *Neocallimastix frontalis* RK21 [29]. Зростання швидкості гідролізу бавовни на 82% спостерігалось у *N. frontalis* RK21 у присутності *Methanobrevibacter smithi*. Останній використовує кінцеві продукти гідролізу, солі мурашиної кислоти та H_2 як субстрати, зменшуючи тим самим інгібуючий вплив продуктів гідролізу бавовни на целюлази [29]. Хоча вважають, що індукція, катаболітна репресія, інгібування продуктом та лімітування вуглецевого живлення регулюють механізм синтезу целюлаз у бактерій та грибів, на молекулярному рівні це питання потребує детального дослідження.

Біохімічна характеристика та очищення компонентів мікробних целюлазних комплексів

За сучасними уявленнями, більшість целюлозолітичних ензимів є модульними мультидоменними протеїнами, що містять три функціонально різні елементи (рис. 1): каталітичний домен (КД), целюлозозв'язувальний домен (ЦЗД) та лінкер, що їх об'єднує [30]. Окрім цих основних фрагментів у структурі целюлаз різного походження можуть бути присутні й інші елементи, включаючи другий КД, фібронектин-III-подібні домени, повторювані гідрофобні послідовності так званого когезиндокеріно-

вого типу тощо [31]. Як правило, кожен з ензимів целюлазного комплексу представлений рядом множинних форм, що є продуктом як експресії різних генів, так і посттрансляційної модифікації — обмеженого протеолізу та (або) деглікозилування. Ці форми часто мають близькі біохімічні характеристики, що значно ускладнює отримання їх в очищеному вигляді.

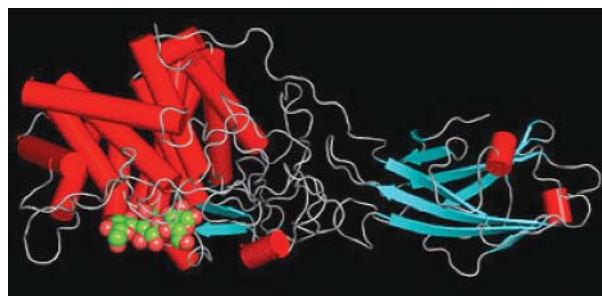


Рис. 1. Модель целюлази *T. fusca*, що базується на PD-структурі 1JS4

Ендоглюканази є найбільш дослідженими компонентами целюлазних комплексів і, як правило, складаються з одного поліпептидного ланцюга. Єдиним винятком є ензим із *Sclerotium rolfsii*, який має дві субодиниці (22 та 32 кДа), що зв'язані між собою S-S зв'язком [31]. Частіше молекулярна маса ендоглюканаз з мікробних джерел коливається в інтервалі 30–50 кДа. Із культуральної рідини низки мікроорганізмів виділено низькомолекулярні ендоглюканази з молекулярною масою менше 20 кДа, які, на думку авторів [32], є фрагментами більш високомолекулярних попередників.

На цей час вивчено амінокислотний склад багатьох ендоглюканаз [33]. Для всіх ензимів характерним є високий вміст Asp, Glu, Thr, Ser, Gly та дуже мала кількість, або взагалі відсутність, Cys та Met. Високий вміст кислих та оксіамінокислот визначає діапазон ізоелектричних точок ензимів. Як правило, pI знаходиться в інтервалі 3,0–5,0.

Майже всі ендоглюканази є глікопротеїнами. Загальний вміст вуглеводів може сягати 50% від загальної маси (табл. 2). Основними компонентами вуглеводної частини є маноза, галактоза, N-ацетилглюкозамін та N-ацетилгалактозамін [34]. Зазвичай до складу целюлазних комплексів входить низка ендоглюканаз, які можуть відрізнятися за сорбційною здатністю до целюлози у сотні разів.

Целобіогідролази до цього часу виділено з меншої кількості джерел, що пов'язано з відсутністю селективних методів визначення їх у суміші з ендоглюканазами. Як

Таблиця 2. Вміст вуглеводів у целюлазах з різних мікробних джерел [33]

Ензим	Джерело	Вміст вуглеводів, %
Ендоглюканаза	<i>Clostridium thermocellum</i>	11,0
	<i>Talaromices emersonii</i>	27,7–50,8
	<i>Sporotrihum pulverulentum</i>	2,2–10,5
	<i>Aspergillus niger</i> <i>A. fumigatus</i>	0
	<i>Trichoderma viride</i>	0–15,9
Целобіогідролаза	<i>Fusarium lini</i>	5,4–6,5
	<i>Penicillium funiculosum</i>	9,0
	<i>Sclerotium rolfsii</i>	7,0
	<i>Trichoderma reesei</i>	7,0
	<i>Trichoderma viride</i>	0–10,0
Целобіаза	<i>Aspergillus niger</i>	2,8
	<i>A. terreus</i>	0
	<i>A. aculeatus</i>	15,0–23,0
	<i>Trichoderma reesei</i>	10,0
	<i>Trichoderma viride</i>	0–10,0
	<i>Gladiolus candidus</i>	9,0

і ендоглюканази, целобіогідролази є в більшості випадків глікопротеїнами з молекулярною масою 55–65 кДа (табл. 3). Ізоелектричні точки містяться в діапазонах 3,8–4,2 та 5,5–6,5. Загалом біохімічні характеристики целобіогідролаз та ендоглюканаз дуже близькі, що ускладнює їх розділення. Целобіази звичайно мають більшу молекулярну масу (120–180 кДа), яка може ще й зростати через здатність ензиму до асоціації з утворенням комплексів. Ізоелектричні точки лежать у близькій до нейтральної ділянці, хоча більшість має рІ 4,5–5,5. За адсорбційною здатністю целобіази поступаються іншим компонентам целюлазного комплексу, що дозволяє виділяти їх методами афінної хроматографії на целюлозі.

У табл. 4 подано приклади одержання гомогенних целюлаз з різних мікробних джерел. Як впливає з наведених даних, в усіх випадках для одержання високоочищених ензимів необхідні 4–6 стадій. Окрім подібності різних компонентів комплексів за біохімічними характеристиками, складність процесу отримання очищених целюлаз пов'язана з великою кількістю домішок протеїнової природи (присутністю різних протеїнів та ензимів). Тому для кожного продуцента розробляють оригінальні схеми очищення ензимів. Для фракціонування целюлаз застосовується практично весь спектр

методів очищення та носіїв (табл. 4). Часто для одержання множинних форм, переважно целобіогідролази, використовують препаративні ізоелектрофокусування та електрофорез, хоча вихід целюлозолітичних ензимів у разі їх використання не перевищує 50%. Висока роздільна здатність методів ВЕРХ дозволяє отримувати окремі целюлази без попереднього групового очищення, однак це різко зменшує робочий ресурс колонок. Слід зазначити, що попередня оптимізація умов культивування продуцента за такими показниками, як загальна та питома активність, а також відсутність протеїну значно спрощує виділення та очищення окремих ензимів целюлазного комплексу.

Для тонкого фракціонування очищених груповими методами целюлазних комплексів *T. reesei*, *M. thermophila* і *A. niger* досліджено можливість використання ексклюзивної хроматографії на колонках типу TSK 2000 і 3000 SW (LKB), аніонобмінної ВЕРХ на Mono Q та TSK-DEAE SW, катіонобмінної хроматографії на Mono S, високоефективного хроматофокусування на Mono P (Pharmacia), гідрофобної хроматографії на колонках TSK-Phenyl 5PW (LKB).

Таблиця 3. Властивості целюлаз

Ензим	Джерело	М.м., кДа	pH-опти- мум	Термо- оптимум	Специфічність
Целюлаза, ро- дина 5, ЦЗД 3 [66]	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	54,0	7,0	50 °C	Авіцел, КМ-целюлоза, β- глюкан, ксилан
Ендоглюкана- за, родина 5 [67]	<i>Bacillus licheniformis</i>	37,0	6,0	65 °C	n-НФ-целобіозид, β-глюкан ячменю, ліхенан
Ендоглюканаза [68]	<i>Bacillus agaradhaerens</i>	38,0	7,0–9,4	60 °C	КМ-целюлоза
Ендоглюканаза [69]	Рекомбінантна	41,2	6,5	45 °C	β-Глюкан ячменю, ліхенан
Ендоглюканаза [70]	<i>Thermomonospora sp.</i>	14,2	5,0–9,0	50 °C	Целюлоза, ксилан
Ендоглюканаза [71]	<i>Penicillium occitanis mutant Pol 6</i>	31,0 та 28,0	pI 3,0 та 7,5	60 та 50 °C	КМ-целюлоза, фосфорильо- вана целюлоза, β-глюкан, ксилан
Екзо-1,4-β-глю- каназа [72]	<i>Clostridium stercorarium</i>	87,0	5,0–6,0 (pI 3,9)	75 °C	Авіцел, КМ-целюлоза, β- глюкан ячменю
Екзоглюканаза [73]	<i>Chaetomium olivaceum</i>	88,0	5,2	45 °C	α-Целюлоза, фільтруваль- ний папір
Целобіогідро- лаза [74]	<i>Paenibacillus sp.</i>	118,0	6,0 (pI 4,85)	45 °C	Ацидильована целюлоза, Авіцел, целодекстрини
β-Глюкозидаза [75]	<i>Piptoporus betulinus</i>	36,0	4,0 (pI 2,6)	60 °C	Целобіоза та целоолігосаха- риди, відщеплює галактозу, манозу та ксилозу від оліго- сахаридів
β-Глюкозидаза, родина 3 [76]	<i>Aspergillus niger</i>	200,0	3,0–4,5	65 °C	Целобіоза
Целобіаза, Cel8A [77]	<i>Lysobacter sp.</i>	41,0	5,0	40 °C	КМ-целюлоза, хітозан, ко- лоїдний хітозан та хітин, розчинний хітозан
Ксиланаза [78]	<i>Syncephalastrum racemosum Cohn.</i>	29,0	8,5 10,5	50 °C	Ксилан
Ксилоглюкана- за [79]	<i>Aspergillus japonicus Chrysosporium lucknowense Trichoderma reesei</i>	32,0 78,0 75,0– 105,0	pI 2,8 pI 3,8 pI 4,1–4,3	НД	Ксилоглюкан тамаринду

Примітка: НД — немає даних.

Структурно-функціональна характеристика целюлазних систем аеробних та анаеробних мікроорганізмів

Найповніше на цей час охарактеризовано целюлазні системи грибів *Phanerochaete chrysosporium*, *S. pulverulentum* [6], *F. solani* [35], *P. funiculosum/pinophilum* [36], *T. emersonii* [37], *T. koningii* [38] і *T. reesei* [27]. Целюлазні системи цих грибів складаються з ендо-1,4-β-D-глюканази [1,4-β-D-глюкан глюканогідролаза; ЕС 3.2.1.4], екзо-1,4-β-D-глюканази [1,4-β-D-глюкан целобіогідролаза (ЦБГ), ЕС 3.2.1.91] та β-глюкозидази [целобіаза або β-D-глюкозид глюкогідролаза; ЕС.3.2.1.21] (табл. 5).

Ендоглюканази хаотично атакують фосфорильовану целюлозу, КМ- та аморфну целюлозу з вивільненням целоолігосахаридів. ЦБГ гідролізують фосфорильовану целюлозу та авіцел, послідовно відщеплюючи целобіозу з нередукуючого кінця [12]. За допомогою мічених целоолігосахаридів було показано, що ЦБГ здатна відщеплювати целобіозу також і з редукуючого кінця [39]. Ендоглюканази та ЦБГ діють синергічно, забезпечуючи гідроліз кристалічної целюлози, а β-глюкозидаза завершує гідроліз, перетворюючи целобіозу на глюкозу. Екзо-β-D-глюканази (ЕС 3.2.1.74) *P. funiculosum* і *T. emersonii* каталізують відщеплення глюкозних залишків з нередукуючого кінця целодекстринів і не кооперуються

Таблиця 4. Очищення та характеристика одержаних ензимів целюлазного комплексу з різних мікробних джерел

Продуцент	Етапи очищення	Характеристика препарату
<i>Chrysosporium lucknowense</i> [80]	Ультрафільтрація, обессолювання на акрилексі П2 (Reanal, Угорщина), аніонообмінна хроматографія на колонці Source 15Q (Pharmacia, Швеція), аніонообмінна хроматографія на колонці Mono Q, хроматофокусування на Mono P	Виділено 6 ендоглюканаз з м.м. 25 (pI 4,0), 28 (pI 5,8), 44 (pI 6,0), 47 (pI 5,7), 51 (pI 4,8) та 60 кДа (pI 3,7) і 2 целобіогідролази — 65 кДа (pI 4,5) та 43 кДа (pI 4,2). рН-оптимум для всіх ензимів — у діапазоні 4,5–6,0
<i>Clostridium thermocellum</i> [81]	Осадження сульфатом амонію, ультрафільтрація крізь полісульфонову мембрану, іонообмінна хроматографія на DEAE-сефарозі, гель-фільтрація на сефарозі CL-4В та сефакрилі S-300, хроматофокусування на Mono P	2 ендоглюканаз — 75,9 та 44,7 кДа, pI 5,0 та 5,9, рН-оптимум — 5,7 та 4,8
<i>Anaerocellum thermophilum</i> [81]	Осадження сульфатом амонію та багаторазова гель-фільтрація на Акрилексі Р6 у діапазоні концентрацій сульфату амонію	Ендоглюканаз (одна гідролізує КМ-целюлозу, а друга — фільтрувальний папір), ензими стабільні при рН 4,0–8,0 та термостабільні (період інактивації при 85 °С — 150 хв)
<i>Fibrobacter succinogenes</i> [82]	Афінна хроматографія, іонообмінна хроматографія на DEAE-Sephacrose CL-6В у градієнті NaCl, хроматографія на гідроксіапатиті, концентрація за допомогою SDS-ПААГ	Виділено EG1, Cel9В, Cel9ВΔВТD, Cel5Н, Cel8В, ClCBase, Cel10А з активністю 84, 40, 47, 0,31, 1,08, 14,2 та 11,6 Од/мг. ЦЗД мали Cel5Н, ClCBase, Cel10А. Стимуються у присутності Ca ²⁺ або Mg ²⁺
<i>Cryptococcus sp.</i> [83]	Ультрафільтрація, аніонообмінна хроматографія на DEAE-5PW, гель-фільтрація на TSK-Gel G3000SW	Карбоксиметилцелюлаза, 34 кДа, термооптимум 40–50 °С, рН-оптимум 3,5. Гідролізує Авіцел, КМ-целюлозу, SIGMA-CELL(R)
<i>Trametes hirsuta</i> [84]	Осадження сульфатом амонію, іонообмінна хроматографія на DEAE-Sephacrose CL-6В, гель-фільтрація на Toyoperl HW 50S	Ендоглюканаза рекомбінантна, рН 5,0, стабільна в діапазоні 3,0–8,0, термооптимум 50 °С. Високоспецифічна щодо кристалічної целюлози
<i>Pyrococcus horikoshii</i> [85]	Фракціонування сульфатом амонію, аніонообмінна хроматографія на HitrapQ	Ендоглюканаза, гідролізує <i>p</i> -нітрофеніл целобіозу, КМ-целюлозу, Авіцел
<i>Lysobacter sp.</i> [77]	Фракціонування сульфатом амонію, іонообмінна хроматографія на SP Toyoperl 650 M, ультрафільтрація, гель-фільтрація на Superdex 200, 2 послідовні хроматографії на сефарозі HP у градієнті NaCl	Целобіаза та хітозаназа, целобіаза гомологічна до β-1,3-1,4- <i>D</i> -глюканази з <i>Bacillus circulans</i> WL-12 та ендоглюканази <i>B. circulans</i>
<i>Bacillus megaterium</i> [86]	Афінна хроматографія на целюлозі та гель-фільтрація на Sepharose 4В	Целюлосоми з целюлазами та ксиланазами, специфічні до КМ-целюлози та Авіцелу
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> [87]	Гель-фільтрація на Sephacryl S-300	Дві β-глюкозидази, 57 та 110 кДа, гідролізують <i>p</i> -нітрофеніл-глюкозид та целобіозу
<i>Trichoderma sp.</i> [88]	Гель-фільтрація на Sephacryl S-200, іонообмінна хроматографія на DEAE-Sephadex A-50, афінна хроматографія на Con A-Sephacrose, хроматофокусування на Mono-P (HPLC)	Ендоглюканаза, 51 кДа, гомологічна до <i>Trichoderma reesei</i>
<i>Trichoderma harzianum</i> [89]	Хроматографія на Sephacryl S-300, DEAE-Sephadex A-50, та Mono P	β-Глюкозидаза, 75 кДа

з ендоглюканазами для гідролізу кристалічної целюлози. Гриби коричневої гнилі (*Poria placenta*, *P. carbonica*) на відміну від грибів, збудників білої (*S. pulverulentum*) та м'якої гнилі (*F. solani*, *P. pinophilum*, *T. reesei*), продукують тільки ендоглюканазу [40].

Більшість грибних целюлаз є глікопротеїнами і мають множинні форми. Чотири імунологічно споріднені ЦБГ з *T. viride* відрізняються одна від одної складом нейтральних вуглеводів [41]. Так само чотири ендоглюканазу з *T. emersonii* відрізнялися

Таблиця 5. Компоненти целюлаз аеробних грибів та характер їхньої дії на целюлозні ланцюги

Ензим	ЕС код	Синонім	Тип дії
Ендо-1,4-β-D-глюканаза	ЕС 3.2.1.4	Ендоглюканаза, ендоцелюлаза	$\begin{array}{c} -\Gamma-\Gamma-\Gamma-\Gamma- \\ \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Хаотично} \end{array}$
Екзо-1,4-β-D-глюканаза	ЕС 3.2.1.91	Целобіогідролаза, екзоцелюлаза	$\begin{array}{c} \Gamma-\Gamma-\Gamma-\Gamma- \\ \uparrow \\ \text{Відщеплює целобіозу від відновлювального та невідновлювального кінця} \end{array}$
Екзо-1,4-β-D-глюканаза	ЕС 3.2.1.74	Екзоглюканаза, глюкогідролаза	$\begin{array}{c} \Gamma-\Gamma-\Gamma-\Gamma- \\ \uparrow \\ \text{Відщеплює глюкозу з невідновлювального кінця} \end{array}$
β-Глюкозидаза	ЕС 3.2.1.21	Целобіаза	$\begin{array}{c} \Gamma-\Gamma \quad \Gamma-\Gamma-\Gamma-\Gamma \\ \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Відщеплює глюкозу від целобіози та коротколанцюгових целоолігосахаридів} \end{array}$

Примітка: «Γ-Γ» — зв'язані глюкозні залишки.

тільки за ступенем глікозилювання [42]. Показано, що на відміну від них, ЦБГ I і II, які продукуються культурами *T. reesei* і *P. funiculosum*, є імунологічно неспорідненими, а дві ЦБГ з *Fusarium lini* відрізнялися за амінокислотним складом [7].

Загалом вважають, що позаклітинні целюлазні компоненти більшості грибів існують як індивідуальні об'єкти. Однак є дані щодо агрегації позаклітинних целюлаз у *T. reesei* [43]. Цей комплекс складається з шести протеїнів і виявляє целюлазну, β-глюкозидазну і ксиланазну активності. Можливо, протеїни зв'язуються з іншими компонентами клітинної стінки із залученням іонів Ca²⁺ [43]. Хоча багато грибів виділяють окремі целюлазні компоненти в культуральну рідину, ще остаточно не з'ясовано, як ці компоненти взаємодіють на поверхні кристалічної целюлози, забезпечуючи її повний гідроліз.

Дослідження на анаеробних грибах рубця свідчать про те, що ці мікроорганізми відіграють певну роль у початковій колонізації і деградації лігноцелюлози у рубці [44]. Було показано, що ці гриби продукують позаклітинні целюлази та ксиланазу, які забезпечують деградацію лігноцелюлози [45].

Описано анаеробні целюлолітичні гриби, що належать до родів *Neocallimastix*, *Cacomyces*, *Orpinomyces*, *Piromyces*, і *Ruminomyces*. На відміну від аеробних грибів, система *N. frontalis* — багатокомпонентний ензиматичний комплекс, що має назву фактора розчинення кристалічної целюлози (ФРКЦ). Його молекулярна маса — 700 кДа; складається з ряду субодиниць з молекуляр-

ною масою від 68 до 135 кДа [46]. Поки що не вдалося роз'єднати ФРКЦ без втрати специфічної активності щодо кристалічної целюлози. Присутність багатокомпонентного комплексу цього гриба свідчить про можливість гідролізу кристалічної целюлози за механізмом, подібним до механізму дії анаеробної бактерії *C. thermocellum*. Целюлази *N. frontalis* (RK 21) — найефективніші з відомих на цей час деструкторів кристалічної целюлози, оскільки відіграють важливу роль у перетравленні целюлози в рубці. Тому видається цікавим дослідити механізм целюлозної деградації за допомогою целюлазної системи цього гриба.

Полісахаридгідролазні системи, що синтезуються аеробними грибами, найповніше вивчено на прикладі ензимів родів *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Phanerochaete*, *Schizophyllum* [31]. Кількість «целюлолітичних» протеїнів у цих системах визначається десятками, але зазвичай більшість із них є гомологами або ж множинними формами обмеженого набору основних компонентів, які відрізняються структурою та механізмом дії. Так, у складі найбільш досліджених комплексів *T. reesei* та *H. insolens* таких компонентів не менше семи: дві целобіогідролази (I і II, родини 6/B та 7/C відповідно) і, принаймні, п'ять ендоглюканаз: I (7/C); II (5/A5); III (12/H); IV (61), V (45/K), VI (6/B) — у дужках вказано належність КД до відповідної структурної родини. В останні роки з'явилися відомості щодо існування у грибів ендоглюканази VI, здатної міцно сорбуватися на целюлозі; частина з них, окрім КД, несе ЦЗД родини I,

причому у різних грибів ЦЗД, ймовірно, не закріплено за строго визначеними родинами КД. Поряд із цим у складі целюлозолітичної системи грибів виявлено ряд ксиланаз (родина 10/F, 11/G) та мананаз (5/A1), частина з яких також несе ЦЗД. Загальна кількість генів, які беруть участь у розкладі рослинного субстрату та більш-менш координовано індукуються целюлозою, целобіозою, лактозою, софорозою або арабітом та репресуються глюкозою, становить близько 20 і розташовані вони у різних хромосомах гриба. Крім *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2*, *egl3*, *egl4*, *egl5*, *xyn1*, *xyn2*, *man1*, які відповідають вищезазначеним ферментам *T. reesei*, це — *bgl1*, *bgl2* (гени β -глюко- та ксилозидази), *axe1* (ген ацетилксиланестерази), *glr1* (ген β -глюкуронідази), *arf1* (ген α -L-арабінофуранозідази), *agl1*, *agl2*, *agl3* (гени α -галактозидаз). Ферменти, які їх кодує, беруть участь у відщепленні замісників в основних ланцюгах геміцелюлоз [47]. Механізм взаємодії різних типів целюлаз у процесі деградації впорядкованої целюлози, а також характерне явище синергізму целюлазних систем обговорюється досить давно. Однак спроби звести всі феномени до екзо-, ендосинергізму, який спостерігається в амілаз, виявилися марними. По-перше, треба відзначити більше різноманіття структурних типів целюлолітичних ферментів. Іноді навіть не вдається провести паралель між енд- та екзогідролазами, що беруть участь у процесах деградації целюлози та крохмалю.

Основним елементом грибних целюлозолітичних систем є ЦБГ I [48]. За механізмом дії вона істотно відрізняється від відповідної екзогідролази амілолітичної системи — β -амілази. Як і всі гідролази родини 7/C, грибна ЦБГ I зберігає конфігурацію зв'язку в продуктах реакції та каталізує процеси трансглікозилування. Низькомолекулярні субстрати вона атакує поблизу відновлювального кінця. Особливістю ЦБГ I є активний центр, який являє собою не звичайну для ендогідролаз заглибину (ложбину), а наскрізний тунель вздовж увігнутої частини β -сендвіча, перекритий зверху гнучкими петлями, які зшиті дев'ятьма S-S-містками [31]. Встановлено, що КД містить 10 субсайтів зв'язування глюкозних залишків — від -7 до +3. Можливий механізм каталізу включає зв'язування целононаози на субсайтах від -7 до +2, утворення целобіози на аглюконових ділянках +1 та +2 й карбокатиону гептанози на субсайтах від -7 до -1, його ковалентне зв'язування із залишком E212, гідроліз глікозилензиму та

десорбцію продуктів. Фермент не має абсолютної специфічності до положення 4-OH у вуглеводного залишка, що локалізується на субсайті -2: він може діяти на флуорогенні похідні як целобіози, так і лактози. Є досить багато даних про те, що ЦБГ I здатна генерувати на поверхні целюлози нові кінцеві групи, що свідчить про наявність у неї не тільки екзо-, а й ендогідролазних властивостей [49]. Однак досі не ясно, як це відбувається з огляду на тунельну структуру активного центру.

Саме ЦБГ I необхідна для розщеплення нативної целюлози, причому у цьому процесі беруть участь усі три складові: КД, С-кінцевий ЦЗД та лінкер, що їх пов'язує. Припускають, що фермент використовує вільну енергію глікозидного зв'язку для руйнування кристалічної структури субстрату, однак як саме, ще не встановлено.

У другій екзоглюканази — ЦБГ II активний центр утворюється двома поверхневими петлями на жорсткій структурі незавершеної тріозофосфат-ізомеразної структури (ТІМ-барел) і має форму більш короткого тунелю завдовжки 2 нм. У середині його розташовані 4 сайти зв'язування глюкозних залишків: -2, -1, +1, +2 (нумерація від зв'язку, що розщеплюється). Окрім того є ще один підсайт +4, розміщений поза тунелем. Фермент містить N-кінцевий ЦЗД родини I. Специфічність ЦБГ II вузька — фермент не діє на гетерозидний зв'язок у флуорогенних похідних целоолігосахаридів.

Одна з двох основних ендоглюканаз *T. reesei*, ендоглюканаза I [47], належить до тієї самої родини, що й ЦБГ I (7/C), і має близьку третинну структуру. Однак у неї активний центр має вигляд щілини. Ендоглюканаза I розщеплює як целобіозиди, так і лактозиди 4-метилумбеліферону, а на ксилані має таку саму активність, як і в разі використання похідних целюлози. У процесі гідролізу фермент віддає перевагу внутрішнім зв'язкам у целотетра-, пента- та гексаозі, а в присутності високих концентрацій целотріози (12–20 мМ) має здатність до трансглікозилування. На ксилотри-, тетра-, пента- та гексаозі він виявляє специфічність до гідролізу другого від відновлювального кінця зв'язку, віддаючи перевагу субстратам з довшим ланцюгом. У різних грибів фермент може як містити, так і не містити С-кінцевий ЦЗД.

Ендоглюканаза II грибних целюлазних систем належить до родини 5/A5 зі структурою ТІМ-барела та розташуванням активного центру на кінцях четвертого й сьомого

β-тяжів. За специфічністю дії на целоолігосахариди цей ензим істотно відрізняється від ендоглюканази I, яка є строго специфічною щодо похідних целюлози. Ендоглюканаза II ефективніше знижує ступінь полімерізації КМ-целюлози, для неї менш характерними є реакції переносу з участю целотріози, хоча вони й не виключаються. До її складу входить N-кінцевий ЦЗД родини I.

Ендоглюканази I і II та ЦБГ I і II є основними в ензиматичній системі *T. reesei* і синтезуються грибом синхронно у співвідношенні приблизно 6:1,5:1:1, хоча їхні гени розміщені на різних хромосомах. Саме цим ензимам приписують основну роль у синергічній деградації впорядкованої целюлози. Інші, мінорні, ендоглюканази (знайдено не менше трьох), можливо, потрібні для утворення індуктора целюлаз.

Грибна ендоглюканаза III (*T. reesei*) є невеликим протеїном (218 АҚ), який не містить ЦЗД. Активний центр ендоглюканази III, розташований у глибокому каньйоні між β-листами, може вміщувати 5 глюкозних залишків. Їй притаманна висока здатність до реакцій трансглікозилювання.

Ендоглюканаза IV, яка належить до нової родини 61, охарактеризовано відносно недавно і поки немає даних про її просторову структуру і механізм каталізу.

Ендоглюканаза V виявлено у багатьох грибів. Цей ензим має невеликий КД, згорнутий у 6β-барел (родина 45/К), активний центр у вигляді тунелю з шістьма сайтами зв'язування і ЦЗД родини I на C-кінці. На відміну від інших ендоглюканаз, цей ензим перетворює конфігурацію біля аномерного центру в продуктах гідролізу. Ензим не розщеплює ксилани, манани та галактоманани.

Особливістю ензиматичної системи *H. insolens* є не знайдена в інших грибів ендоглюканаза VI, яка близька до ЦБГ II та ряду бактеріальних ендоглюканаз родини 6/В. У цьому ензимі відсутній ЦЗД. Найбільшу активність він виявляє на целогексаозі й подібно до ЦБГ II переважно розщеплює другий з невідновлювального кінця глікозидний зв'язок.

Слід відзначити також деякі модульні ензими, які входять до складу целюлазно-геміцелюлазного комплексу грибів, що несуть ЦЗД і, відповідно, залучені до реакцій на поверхні целюлози. Це передусім ксиланаза *F. oxysporum* (10/F) та β-мананаза *T. reesei* (5/A1) [31].

Ензиматичні системи актиноміцетів та аеробних бактерій мають низку спільних рис з ензимами грибів. Найбільш дослідже-

ними вони є у бактерій *C. fimi* і *P. fluorescens subsp. cellulosa* та актиноміцета *T. fusca*. Грампозитивна бактерія *C. fimi* утворює ендоглюканази CenA, B, C та D, ЦБГ CbhA та B, екзоглюканазу-ксиланазу Cex та ксиланазу XynD1, XynD2. Їхні молекули побудовані з кількох автономних модулів і мають довжину поліпептидного ланцюга від 400 до майже 1100 залишків. CenA має КД родини 6/В та N-кінцевий ЦЗД типу IIa, розділені лінкером. CenB — великий мультидоменний протеїн з КД родини 9/E2 та жорстко зв'язаним з ним ЦЗД типу IIIb, а також C-кінцевим ЦЗД типу IIa. Між двома ЦЗД розташовані розділені лінкерами три повтори фібронектин III-подібного домену, що, ймовірно, відповідає за зв'язування ензиму на клітинній мембрані або за утворення позаклітинного мультисубодиночного комплексу ензимів. CenC має КД родини 9/E1 та N-кінцевий ЦЗД типу IV, які розділені лінкером. Цей тип ЦЗД специфічний щодо аморфної целюлози.

Серед екзогідролаз *C. fimi* Cex (10/F) має незвичайну субстратну специфічність, оскільки здатний розщеплювати як целюлозу, так і ксилан. Особливістю ЦЗД Cex є його здатність до міцної сорбції на кристалічній целюлозі, хітині та, меншою мірою, на аморфній целюлозі.

Окрім цього було клоновано ендомананазу Man26A та β-манозидазу Man2A *C. fimi*. У бактерії Man26A піддається протеолізу і, можливо, є єдиною мананазою; показано, що цей ензим частково зв'язаний з клітинами.

Відносно більш проста ензиматична система термофільного мікроміцета *T. fusca* складається з шести компонентів E1–E6, що містять ЦЗД родини II. Два ензими, E3 та E6, є екзоцелюлазами, причому E3 діє з невідновлювального, а E6 — з відновлювального кінця. E1, E2 та E5 — ендоцелюлази, а E4 має проміжні властивості та здатність посилювати дію як ендо-, так і екзоцелюлаз. Подібність цієї системи із системою *C. fimi* пояснюють конвергентною еволюцією. Крім глюканаз, до складу целюлазної системи актиноміцетів входить також термостабільна ксиланаза A, що належить до родини 11/G.

У стрептоміцетів також знайдено целюлази родини 5/A2, 6/В, 9/E1 та ксиланазу 11/G. Додатково виявлено мананазу (5/A4) і ксиланазу (10/F), які не містять ЦЗД, а також ацетилксиланестеразу та хітиназу, що несуть ЦЗД родин IIb та IIa відповідно.

Целюлазні системи *C. fimi* та актиноміцетів можна розглядати як перехідні між грибами і бактеріями. Незавершена структура

ТІМ-барела ендоглюканази E2 з *T. fusca* відрізняється від аналогічної структури грибною ЦБГ II тим, що у неї вкорочені петлі, які перекривають тунель активного центру, через що він має форму улоговини. Ця глюканаза має найбільшу активність щодо КМ-та аморфної целюлози і погано розщеплює кристалічний субстрат. Ензим E4 *T. fusca* не має аналогів серед грибних целюлаз. Його КД є (α, α)6-барелом, у якого петлі на С-кінці внутрішніх спіралей формують активний центр. З N-кінця до нього жорстко прикріплений імуноглобуліноподібний ЦЗД із 90 залишків, які укладено у вісім β -тяжів. При цьому вхід в активний центр є продовженням ЦЗД. Таким чином, активний центр складається ніби з двох частин — відносно плоскої, характерної для ЦЗД, та щілиноподібної, притаманної КД.

Бактерія *P. fluorescens subsp. cellulosa* утворює целюлолітичну систему, ще меншою мірою подібну до системи грибів. До неї входить не менш ніж три ендоглюканази, целодекстриназа, п'ять ксиланаз та чотири мананази, а крім цього присутній широкий спектр ензимів, що відщеплюють бокові групи в геміцелюлозах [50]. Відзначають подібність двох ензимів псевдомонад: ендоглюканази родини 5/A5 *Ralstonia solanacearum* та CelB *P. fluorescens* родини 45/K з ензимами грибів — ендоглюканазами II і V *T. reesei* та *H. insolens*.

В ензиматичних системах псевдомонад, бацил та *Ervinia spp.* не виявлено типових ЦБГ. Тому їхня функція, імовірно, не зводиться до утилізації целюлози. Деякі з цих ензимів беруть участь у фітопатогенезі, полегшуючи проникнення мікроорганізму до клітини хазяїна або утворюючи сигнальні молекули-олігосахариди, які регулюють фітоімунні реакції [51]. У зв'язку з цим особливий інтерес становить структурна подібність окремих ендоглюканаз та ксиланаз сапрофітних грибів і фітопатогенних бактерій, що може розкрити дійсну функцію численних компонентів целюлолітичної системи мікроорганізмів.

Серед анаеробних бактерій найбільш дослідженими є целюлазно-геміцелюлазні системи термо- та мезофільних кластридій. Целюлосоми *C. thermocellum* містять до 26 поліпептидів, серед них ідентифіковано 12 целюлаз ендо- та екзоглюканазного типу, 3 ксиланази, асоційовані з ацетилксиланестеразами та ферулоїлестеразами доменами, ліхеназа та некаталітичний протеїн, що має назву інтегруючого целюлосому протеїну A (CipA) або скафолдину [31]. Зв'язу-

вання забезпечують консервативні гідрофобні повторювання (2×24 залишка), так звані докерини типу I та комплементарні їм рецептори скафолдину, так звані когезини типу I. Важливу роль у когезиндокериновій взаємодії відіграють іони Ca^{+2} [31]. Когезинові домени складені у вигляді дев'ятитяжєвих β -барелів, подібних за структурою до ЦЗД родин II та III, незважаючи на повну відсутність гомології. Крім 9 когезинів типу I, скафолдин несе ЦЗД родини II, а також особливий тип докерину на С-кінці (тип II), який не взаємодіє з когезинами типу I. Когезини типу II для цього докерину містяться в протеїнах, присутніх у S-шарі. Таким чином, скафолдин має у своєму складі необхідні структурні фрагменти для формування целюлосом, для їх фіксації на поверхні клітини та для прикріплення до целюлозного субстрату.

На прикладі ендоглюканази D кластридальних целюлосом, які не містять власних ЦЗД, показано, що активність ензимів щодо мікрористалічної целюлози багаторазово зростає в разі фіксації на нативному або мутантному скафолдині, який несе ЦЗД та єдиний модуль когезину I.

Серед ензимів, фіксованих у целюлосомі, знайдено не тільки ендоглюканази, а й ЦБГ [52]. Найбільш відома з них — ЦБГ CelS(S8), що належить до родини 48/L. У цій родині розшифровано просторову структуру CelF — так званої процесивної ендо-екзоглюканази мезофільної кластридії. Її N-кінцевий КД має структуру (α, α)6-барела з активним центром у вигляді тунелю, що заглиблюється на 2/3 довжини внутрішніх спіралей з боку N-кінця. Зовні тунель переходить у відкрити заглибину, що дозволяє ензиму виявляти властивості як екзо-, так і ендоглюканази. Загальна довжина активного центру становить не менше восьми ангідроглюкозних залишків.

C. cellulolyticum — ще одна анаеробна бактерія, будову целюлосомі якої досліджено. Крім скафолдину, до її складу входить шість целюлазних ензимів (CelA — CelF), які зв'язані каркасним протеїном з когезиндокериновими комплексами. У кластридій цей тип взаємозв'язку є видоспецифічним: когезини ензимів мезофілів не впізнають докерини термофілів і навпаки.

Целюлазно-геміцелюлазні системи анаеробних бактерій істотно відрізняються від ензимних систем аеробів, що пояснюється специфічністю середовища існування. Аероби секретують ензими у невеликий об'єм водної плівки. Відсутність конвекції уможлиблює

(за наявності ЦЗД) іммобілізацію ензимів на субстраті поблизу клітини-продуцента та створення у плівці стійкого комплексу з ефективним дифузійним транспортуванням продуктів гідролізу усередину клітини. У анаеробів аналогічна секреція ензимів призвела б до втрати їх продуцентом та розділення необхідного набору активностей конвективними токами навколишньої рідини. Тому в цих організмів целюлозолітичну систему упаковано в целюлосоми та поліцелюлосоми, які зв'язані з поверхнею клітини. Таким чином забезпечується транспортування продуктів гідролізу від субстрату до прикріпленої клітини мікроорганізму [52]. При цьому в анаеробів трапляються і компоненти «розділених» ензиматичних систем. У свою чергу, аероби можуть мати ензими, у яких поряд із ЦЗД бувають модулі типу фібронектин III-зв'язувальних доменів, які відповідають за зв'язування з клітиною та/або утворення протеїнових асоціатів на поверхні целюлози.

Вважають, що еволюційно більш досконали аеробні мікроорганізми пішли шляхом відбору спеціалізованих «маломодульних» ензимів, які пристосовані до вузького конкретного завдання в малому об'ємі рідини, тимчасом як давніші анаероби зберегли універсальні багатомодульні ензими або утворення типу целюлосом [31].

Целюлозолітичні ензими, яким у традиційній номенклатурі відведено 4 позиції, в сучасній класифікації об'єднані у 15 з 80 відомих структурних родин та кілька підродин глікозилгідролаз, причому до них віднесено і дві родини з численної групи ксиланаз. Целюлазно-геміцелюлазні ензими є в родинах 5(A), 6(B), 7(C), 8(D), 9(E), 10(F), 11(G), 12(H), 26(I), 44(J), 45(K), 48(L), 51, 60 та 61. Ця номенклатура стосується тільки структури КД.

Слід наголосити, що кількість структурних типів 1,4- β -глюкозилгідролаз порівняно з ензимами, що діють на α -глюкозидні зв'язки, значно ширша. Останні представлені тільки трьома родинами. Цікавим є те, що розщеплення ксиланів у еволюційно віддалених організмів відбувається за участю тільки двох родин. Ксиланазу у природі майже завжди знаходять поряд з целюлазами, а їхній субстрат за масштабами відтворення близький до целюлози, хоча значно складніший за неї за своєю хімічною структурою. Проте ксиланазу, як і амілазу, побудовані більш однорідно, ніж целюлази, можливо тому, що еволюційно ці ензими значно молодші за целюлази.

Крім цього, целюлази розділяють на родини за будовою ЦЗД та лінкерів. Прийняту у наш час класифікацію целюлазно-геміцелюлазних ензимів за структурою КД та ЦЗД наведено в роботі Рабиновича та співавт. [53].

Механізм ензиматичної деструкції целюлози

Целюлази каталізують гідроліз целюлози (клітковини), яка в природних матеріалах зв'язана з багатьма іншими сполуками: геміцелюлозою, пектином, лігніном, крохмалем. Природні матеріали містять целюлозу, структура якої має різне співвідношення аморфних ділянок і кристалів. Тому целюлоза не є рівноцінним субстратом для дії ензимів і для деструкції потребує їх комплексу. Невідомо, чи існують ділянки менш упорядкованих ланцюгів у мікрофібрилах целюлози. Реакція целюлази з високоупорядкованою целюлозою відрізняється від її взаємодії з менш упорядкованою целюлозою.

КМ-целюлозу й Авіцел багато дослідників використовують як субстрати. Целюлази, які інгібуються КМ-замісниками, не можна виявити, застосовуючи ці субстрати. Кристалічна целюлоза, така як Авіцел, повільно деградується більшістю очищених целюлаз і тому потребує більше часу для реакції. Було зроблено спроби знайти субстрат, з яким будь-яка целюлаза здатна реагувати задовільно і швидко. Нерозчинний целюлолігосахарид із середнім ступенем полімеризації 20, який утворюється внаслідок гідролізу порошку целюлози соляною кислотою, як виявилось, придатний для цього. У будь-якому разі для характеристики різних компонентів целюлаз грибів потрібен ряд субстратів.

Як вже зазначено вище, целюлазні комплекси, що продукуються різними мікроорганізмами, є поліензимними системами, які складаються з ензимів різної молекулярної будови та способу дії на целюлозу. Слід пам'ятати, що через велике різноманіття целюлазних комплексів та індивідуальних ензимів, які їх складають, а також унаслідок складності будови та великої кількості форм целюлози неможливо дати однозначну та вичерпну картину дії целюлазного комплексу на целюлозу. У спрощеному вигляді її подано на рис. 2.

Основними чинниками, що впливають на властивості целюлазних комплексів, є індивідуальні властивості ендоглюканаз, ЦБГ, а також співвідношення між активностями цих ензимів. До індивідуальних

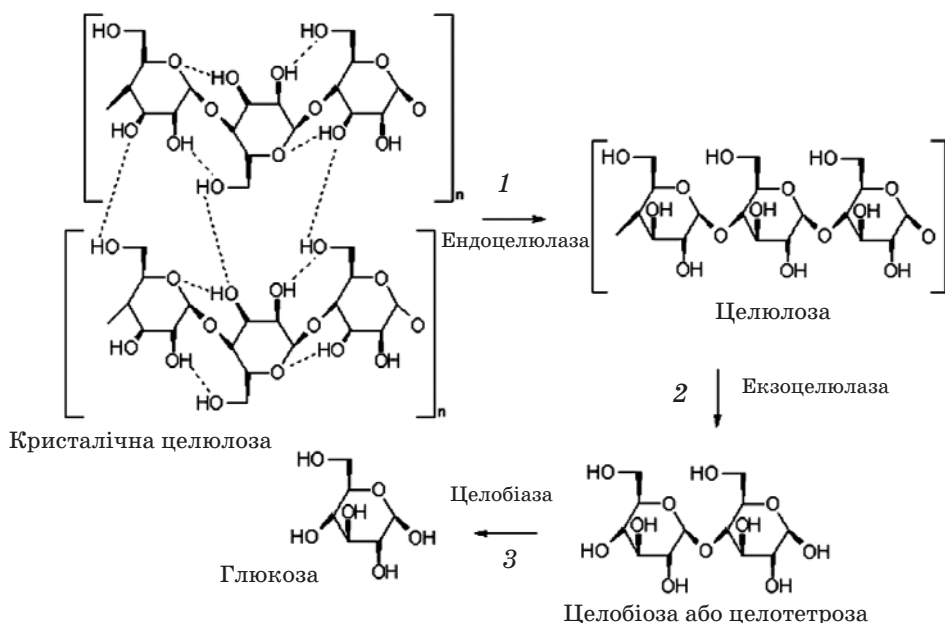


Рис. 2. Три типи реакцій, що каталізуються целюлазами:

- 1 — розщеплення нековалентних зв'язків у кристалічній структурі целюлози (ендоцелюлази);
 2 — гідроліз окремих ділянок целюлози до олігосахаридів (екзоцелюлази);
 3 — гідроліз ди- та тетрасахаридів до глюкози (β -глюкозидази)

властивостей належать спосіб дії на целюлозу та молекулярна активність, їхня здатність адсорбуватися на целюлозі, рН- і температурні оптимуми дії та стабільність.

Співвідношення між ендоглюканазною та целобіогідролазною активностями в комплексі залежать від генетичних властивостей штаму-продуцента. Вкрай важливою є можливість прояву синергізму, тобто явища взаємного посилення дії ензимів, а також їхньої здатності до адсорбції на поверхні целюлаз. Давно встановлено, що чим міцніше ензими сорбуються на целюлозі, тим вищою є їхня здатність до глибокого гідролізу кристалічної целюлози.

Розглянуті закономірності ензиматичної деструкції целюлози найбільш характерні для грибних целюлаз. Характерною особливістю бактеріальних целюлаз є структурованість їх у великі агрегати — целюлосоми.

Незважаючи на накопичення значного обсягу даних щодо вивчення структури окремих ензимів целюлазно-геміцелюлазних систем мікроорганізмів, і досі складно говорити про кардинальні зміни в розумінні механізмів ензиматичної деградації упорядкованої целюлози. Ще на початку 80-х років стало очевидним, що в гідролізі целюлози беруть участь ендоглюканази, які мають додатковий центр зв'язування з целюлозою — сорбційний центр, який отримав назву ЦЗД. Ендоглюканази, які слабо сорбуються,

найактивніше гідролізують зовнішні аморфні ділянки, але не зачіпають упорядкованої частини целюлози [54]. Їх було виявлено в мінорних кількостях у повноцінних целюлозних комплексах грибів *T. reesei* та *P. chrysosporium*. При цьому в комплексі домінували протеїни, які міцно сорбуються і відіграють головну роль у розкладі кристалічної целюлози.

Здатність ензимів, що містять ЦЗД, переміщуватися від однієї частинки субстрату до іншої, встановлено при сумісному застосуванні звичайної та міченої фарбником целюлози [55]. Підтверджено й факти, що свідчать про відсутність ендоглюканаз, які міцно зв'язуються з целюлозою, у целюлазних комплексах *A. niger*, *A. foetidus*, що не розщеплюють впорядковану целюлозу. Ендоглюканази аспергілів належать до родини 12/Н, яка не містить ЦЗД [31].

Загалом механізм гідролізу целюлози виглядає так (рис. 3). Ензим міцно адсорбується на нерозчинному субстраті за рахунок взаємодії ЦЗД з його поверхнею. КД, зв'язаний з ЦЗД через гнучкий лінкер, здійснює серію каталітичних актів, розщеплюючи доступні глюкозидні зв'язки, при цьому десорбції ензиму в розчин не відбувається. Укראй важливою обставиною є властивість ЦЗД руйнувати високовпорядковану кристалічну структуру бавовняних волокон без розщеплення глюкозидних зв'язків.

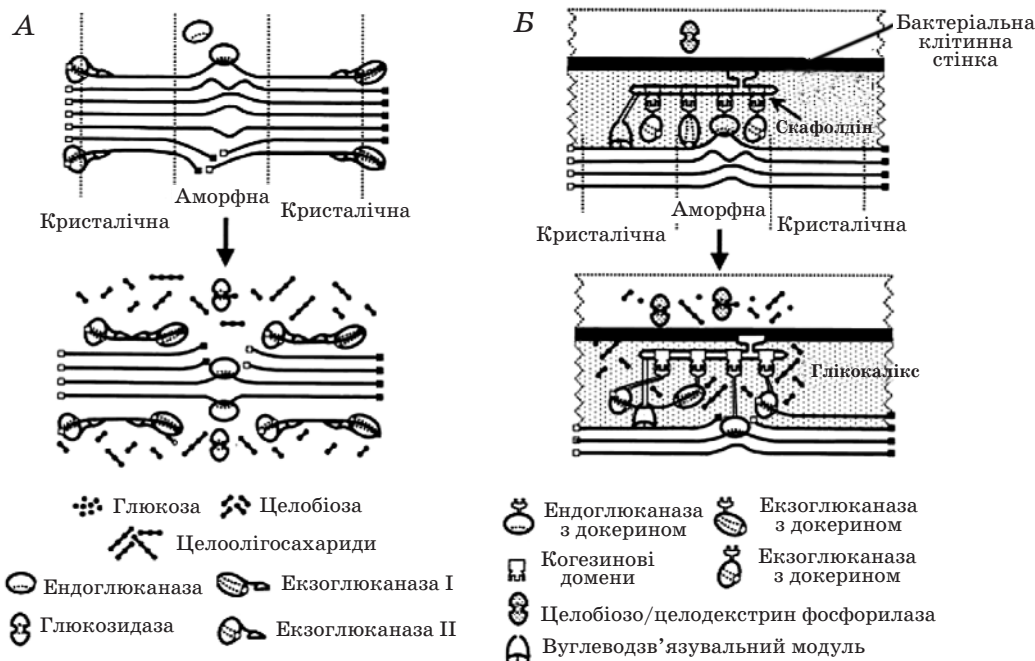


Рис. 3. Схема гідролізу аморфної та мікрокристалічної целюлози грибними аеробними (А) та бактеріальними анаеробними (Б) целюлазними системами. Забарвленими клітинами позначено редукувальні кінці [90]

Такі волокна з порушеною кристалічною структурою набагато легше піддаються гідролітичній деструкції під дією інших целюлаз.

Адсорбційна здатність ензимів, що не містять ЦЗД, дуже мала, і в разі дії на целюлозу вони здійснюють один або декілька послідовних каталітичних актів, після чого ензими можуть легко переноситись у розчині до нових ділянок поверхні нерозчинного субстрату. Як правило, такі ензими не здатні розщеплювати кристалічну целюлозу, а можуть діяти тільки на аморфні (дефектні) ділянки волокон.

Практичне використання целюлаз

Целюлази широко використовують у різних галузях: у сільському господарстві (для годівлі тварин), харчовій, текстильній, паперовій та хімічній промисловості, у паперовому виробництві, у медико-фармацевтичних, генно-інженерних технологіях та в процесах знешкодження відходів.

У харчовій промисловості целюлази застосовують під час екстракції фруктових соків та олій із насіння; для освітлення соків; у процесі очищення бобів сої під час виробництва соєвих соусів; для виділення протеїнів сої та кокосових горіхів; з метою ефективного одержання кукурудзяного та картопляного крохмалю; для желатинізації морських водоростей, аби поліпшити їхні харчові властивості; для одержання агару

з морських водоростей та деградації лігноцелюлози з метою одержання харчових добавок [16, 56, 57]. Їх також використовують для підвищення поживної якості продуктів бродіння, для відновлення зневоднених овочів та сухих супів, у виробництві целюлолігосахаридів, глюкози та інших розчинних вуглеводів із целюлозних відходів, для видалення клітинних стінок, що полегшує виділення ароматичних речовин, протеїнів, полісахаридів [57]. У пивоварному та винному виробництві целюлази застосовують для гідролізу β -1,3 та β -1,4 глюканів, які присутні в низькосортному ячмені, для полегшення фільтрації пива, покращання аромату вин. Рекомбінантні дріжджі, які продукують β -1,3- та β -1,4-глюканази, також використовують у пивоварінні. Целюлази застосовують і як добавки до харчування жуйних тварин та для попередньої обробки лігноцелюлозної сировини й силосу, щоб полегшити процес травлення жуйних тварин, лущення пшеничних зерен [57]. Цікавим прикладним аспектом використання целюлазних генів є їх клонування для отримання трансгенних тварин, які зможуть секретувати целюлази в шлунково-кишковому тракті для поліпшення перетравлювання грубої їжі [16].

У текстильній промисловості целюлазами послуговуються для біопліфування грубої бавовняної тканини з метою одержання джинсових тканин, для видалення

мікрофібрил, які утворюються на тканинах під час різних циклів обробки, для відновлення м'якості та яскравості бавовняних тканин [16, 56].

Поряд із цим целюлази або суміші гліканази можуть бути корисними для утворення рослинних та грибних протопластів у процесі одержання гібридних штамів у різноманітних генетичних експериментах [44].

Таким чином, целюлази мають широкі можливості для застосування в різних технологічних процесах, однак для цього потрібні масштабні дослідження їхніх властивостей та специфічності. Ці дослідження

розвиваються досить швидко. Значного прогресу досягнуто в розумінні синтезу целюлаз, біохімії деградації целюлози, клонуванні та експресії целюлазних генів та встановленні 3-D-структури деяких целюлаз. Головними лімітуючими ланками у використанні комерційних препаратів целюлаз є вихід, стабільність, специфічність та вартість одержання. Тому майбутні дослідження слід зосередити на створенні високопродуктивних, термо- та рН-стійких продуцентів целюлаз, із широкою субстратною специфічністю та високою каталітичною ефективністю, використовуючи недорогі середовища та ензимні технології.

ЛІТЕРАТУРА

1. Экологическая биотехнология / Под ред. К. Ф. Форстера, Д. А. Дж Ве́за. — Л.: Химия. — 1990. — 384 с.
2. Ebel J. Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense // Bioessays. — 1998. — V. 20, N7. — P. 569–576.
3. Fang X., Yano S., Inoue H. et al. Lactose enhances cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus* // J. Biosci. Bioeng. — 2008. — V. 106, N2. — P. 115–120.
4. Ljungdahl L. G., Eriksson K. E. Ecology of microbial cellulose degradation // Adv. Microb. Ecology. — 1985. — V. 8. — P. 237–299.
5. Johnson E. A., Sakajoh M., Halliwell G. et al. Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system from *Clostridium thermocellum* // Appl. Environ. Microbiol. — 1982. — V. 43, N5. — P. 1125–1132.
6. Wood T. M. Properties of cellulolytic enzyme systems // Biochem. Soc. Trans. — 1985. — V. 13, N2. — P. 407–410.
7. Bhat I. S., Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications // Biotechnol. Adv. — 1997. — V. 15, N3/4. — P. 583–620.
8. Bhat S., Goodenough P. W., Owen E. et al. Cellobiose: A true inducer of cellulosome in different strains of *Clostridium thermocellum* // FEMS Microbiol. Lett. — 1993. — V. 111. — P. 73–78.
9. Jindou S., Xu Q., Kenig R. et al. Novel architecture of family-9 glycoside hydrolases identified in cellulosomal enzymes of *Acetivibrio cellulolyticus* and *Clostridium thermocellum* // FEMS Microbiol. Lett. — 2006. — V. 254, N2. — P. 308–316.
10. Sugden C., Bhat M. K. Cereal straw and pure cellulose as carbon sources for growth and production of plant cell wall degrading enzymes by *Sporotrichum thermophile* // World J. Microbiol. Biotechnol. — 1994. — V. 10. — P. 444–451.
11. Ghose T. K. Measurement of cellulase activities // Pure Appl. Chem. — 1987. — V. 59, N2. — P. 257–268.
12. Wood T. M., Bhat M. K. Methods for measuring cellulase activities // In: W. A. Wood, S. T. Kellogg, (Eds.), Meth. Enzymol. — 1988. — V. 160. — P. 87–112.
13. Ryu D. D. Y., Mandels M. Cellulases: biosynthesis and applications // Enzym. Microb. Technol. — 1980. — V. 2. — P. 91–102.
14. Stewart B. J., Leatherwood J. M. Depressed synthesis of cellulase by *Cellulomonas* // J. Bacteriol. — 1976. — V. 128. — P. 609–615.
15. Nisizawa T., Suzuki H., Nisizawa K. Inductive information of cellulase by sophorose in *Trichoderma viride* // J. Biochem. — 1971. — V. 70. — P. 375–385.
16. Beguin P., Anbert J. P. The biological degradation of cellulose // FEMS Microbiol. Rev. — 1993. — V. 13. — P. 25–58.
17. Kubicek C. P., Messner I. L., Gruber F. et al. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle — from the interior life of a secretory fungus // Enz. Microb. Technol. — 1993. — V. 15. — P. 90–99.
18. Reese E. T., Lola J. E., Parrish F. W. Modified substrates and modified products as inducers of carbohydrases // J. Bacteriol. — 1969. — V. 100. — P. 1151–1154.
19. Garcia-Martinez D. V., Shinmyo A., Madia A. et al. Studies on cellulase production by *Clostridium thermocellum* // Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol. — 1980. — V. 9. — P. 189–197.
20. Sternberg D., Mandels G. I. L. Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose // J. Bacteriol. — 1979. — V. 139. — P. 761–769.

21. Nisizawa T., Suzuki H., Nisizawa K. Inductive information of cellulase by sophorose in *Trichoderma viride* // J. Biochem. (Tokyo). — 1972. — V. 71. — P. 999–1007.
22. Pastan I., Adhya, S. Cyclic Adenosine 5' monophosphate in *Escherichia coli* // Bacteriol. Rev. — 1976. — V. 40. — P. 527–551.
23. Entian K. D., Hilbner F., Opitz H. et al. Cloning of hexokinase structural genes from *Saccharomyces cerevisiae* mutants with regulatory mutations responsible for glucose repression // Mol. Cell. Biol. — 1985. — V. 5. — P. 3035–3040.
24. Johnson E. A., Bouehof F., Demain A. L. Regulation of cellulase formation in *Clostridium thermocellum* // J. Gen. Microbiol. — 1985. — V. 131. — P. 2303–2308.
25. Canevascini G., Coudray M. R., Rey J. P. et al. Induction and catabolic repression of cellulase synthesis in the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile* // Ibid. — 1979. — V. 110. — P. 291–303.
26. Messner R., Kubicek-Pranz E. M., Gsur, A. et al. Cellobiohydrolase II is the main conidial bound cellulase in *Trichoderma reesei* and other *Trichoderma* strains // Arch. Microbiol. — 1991. — V. 155. — P. 601–605.
27. Kubicek C. P. The cellulase proteins of *T. reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation // Adv. Biochem. Eng. — 1992. — V. 45. — P. 1–27.
28. Cooper R. M., Wood R. K. S. Induction of synthesis of extracellular cell wall degrading enzymes in vascular wilt fungi // Nature. — 1973. — V. 246. — P. 309–311.
29. Wood T. M., Wilson C. A., McCrae S. L. et al. A highly active extracellular cellulose from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis* // FEMS Microbiol. Lett. — 1986. — V. 34. — P. 37–40.
30. Tomme P., Warren R. A., Gilkes N. R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi // Adv. Microbial. Physiol. — 1995. — V. 37. — P. 1–81.
31. Рабинович М. Л., Мельник М. С., Болобова А. В. Структура и механизм действия целлюлолитических ферментов // Биохимия. — 2002. — Т. 67, вып. 8. — С. 1026–1050.
32. Kanda T., Wakabayashi K. Purification and properties of a lower-molecular-weight endocellulase from *Irpex* // Biochem. J. — 1980. — V. 87. — P. 1625–1634.
33. Синицын А. П., Гусаков А. В., Черноглазов В. М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов / М.: Издательство МГУ. — 1995. — С. 119–120.
34. Рабинович М. Л., Черноглазов В. М., Клевцов А. А. Классификация целлюлаз, их распространенность, множественные формы и механизмы действия целлюлаз // Биоконверсия целлюлозы, микробиология и биохимия. Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. — М., 1988. — Т. 11. — С. 8–149.
35. Wood T. M., McCrae S. L. Cellulase from *Fusarium solani*: purification and properties of the C₁ component // Carbohydr. Res. — 1977. — V. 57. — P. 117–133.
36. Bhat K. M., Hay A. J., Claeysens M., Wood T. M. Study of the mode of action and site specificity of the endo-(1-4)-[3-D-glucanases of the fungus *Penicillium pinophilum* with normal, 3H labelled, reduced and chromogenic cellooligosaccharides // Biochem. J. — 1990. — V. 266. — P. 371–378.
37. McHale A., Coughlan M. P. Synergistic hydrolysis of cellulose by components of the extracellular cellulase system of *Talaromyces emersonii* // FEBS Lett. — 1980. — V. 117. — P. 319–322.
38. Wood T. M., McCrae S. L. Purification and some properties of the extracellular α -glucosidase of the cellulolytic fungus, *Trichoderma koningii* // J. Gen. Microbiol. — 1982. — V. 128. — P. 2973–2982.
39. Vrsanska M., Biely P. The cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* QM 9414: action on cello-oligosaccharides // Carbohydr. Res. — 1992. — V. 227. — P. 19–27.
40. Eriksson K. E., Wood T. M. Biodegradation of cellulose // Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components (Higuchi T., ed.). — New York: Academic Press, 1985. — P. 469–503.
41. Gum E. K. Jr., Brown R. D. Jr. Structural characterization of a glycoprotein cellulase, 1,4-13-D-glucan cellobiohydrolase C from *Trichoderma viride* // Biochem. Biophys. Acta. — 1976. — V. 466. — P. 371–386.
42. Moloney A. P., McCrae S. I., Wood T. M. Isolation and characterization of the 1,4-13-D-glucan glucanohydrolases of *Talaromyces emersonii* // Biochem. J. — 1985. — V. 225. — P. 365–374.
43. Sprey B., Lambert C. Titration curves of cellulases from *Trichoderma reesei*: demonstration of cellulase-xylanase-b-glucosidase containing complex // FEMS Microbiol. Lett. — 1983. — V. 18. — P. 217–222.
44. Vanehop T. The anaerobic fungi in rumen fibre digestion // Agric. Environ. — 1981. — V. 6. — P. 339–348.
45. Lowe S. E., Theodorou M. K., Trinei A. P. J. Cellulase and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose and xylan // Appl. Environ. Microbiol. — 1987. — V. 53. — P. 1216–1223.
46. Wilson C. A., Wood T. M. The anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: isolation and properties of a cellulosome-type enzyme fraction with the capacity to solubilize

- hydrogen bond-ordered cellulose // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1992. — V. 37. — P. 125–129.
47. Srisodsuk M., Lehtio J., Linder M. et al. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I with an endoglucanase cellulose-binding domain: action on bacterial microcrystalline cellulose // J. Biotechnol. — 1997. — V. 57, N1–3. — P. 49–57.
48. Sinitsyn A. P., Gusakov A. V., Grishutin S. G. et al. Application of microassays for investigation of cellulase abrasive activity and backstaining // J. Biotechnol. — 2001. — V. 89, N2–3. — P. 233–238.
49. Barr B. K., Hsieh Y.-L., Ganem B., Wilson D. B. Identification of two functionally different classes of exocellulases // Biochemistry. — 1996. — V. 35, N2. — P. 586–592.
50. Charnock S. J., Spurway T., Xie H. et al. The topology of the substrate binding clefts of glycosyl hydrolase family 10 xylanases are not conserved // J. Biol. Chem. — 1998. — V. 273, N48. — P. 32187–32199.
51. Озерецковская О.Л., Леонтьева Г.В., Чаленко Г.И. и др. О природе олигосахаринов картофеля // Прикл. биохим. микробиол. — 1993. — Т. 29, № 5. — С. 757–764.
52. Morag E., Bayer E. A., Hazlewood G. P. et al. Cellulase Ss (CelS) is synonymous with the major cellobiohydrolase (subunit S8) from the cellulosome of *Clostridium thermocellum* // Appl. Biochem. Biotechnol. — 1993. — V. 43, N2. — P. 147–151.
53. Рабинович М. Л., Мельник М. С., Болобова А. В. Целлюлазы микроорганизмов (обзор) // Прикл. биохим. микробиол. — 2002. — Т. 38, №4. — С. 355–373.
54. Черноглазов В. М., Клесов А. А. Изоферменты эндоглюканазы в целлюлазных комплексах: различное сродство к целлюлозе и неодинаковая роль в гидролизе нерастворимого субстрата // Биохимия. — 1983. — Т. 48, №3. — С. 369–377.
55. Рабинович М. Л., Новикова Т. В., Клесов А. А., Березин И. В. Специфичность сорбции целлюбиогидролазы I *Trichoderma reesei* на производных целлюлозы // Биоорг. химия. — 1985. — Т. 11. — С. 1343–1347.
56. Coughlan M. P. Cellulases: Production properties and applications // Biochem. Soc. Trans. — 1985. — V. 13. — P. 405–406.
57. Mandels M. Applications of cellulases // Ibid. — 1985. — V. 13. — P. 414–415.
58. Wood T. M. Preparation of crystalline, amorphous and dyed cellulose substrates // Wood, W. A., Kellogg, S. T. (Eds.), Meth. Enzymol. — 1988. — V. 160. — P. 19–20.
59. Wood T. M. The cellulase of *Fusarium solani*. Resolution of the enzyme complex // Biochem. J. — 1969. — V. 115. — P. 457–464.
60. Schiraldi C., Martino A., Acone M. et al. Effective production of a thermostable alpha-glucosidase from *Sulfolobus solfataricus* in *Escherichia coli* exploiting a microfiltration bioreactor // Biotechnol. Bioeng. — 2000. — V. 70, N6. — P. 670–676.
61. Wood T. M., McCrae S. L. The purification and properties of the C₁ component of *Trichoderma koningii* cellulases // Biochem. J. — 1972. — V. 128. — P. 1183–1192.
62. Mandels M., Andreotti R., Roche C. Measurement of saccharifying cellulase // Biotechnol. Bioeng. Syrup. — 1976. — V. 6. — P. 17–23.
63. Somogyi M. Notes on sugar determination // J. Biol. Chem. — 1952. — V. 195, N1. — P. 19–23.
64. Nummi M., Fox E. C., Niku-Paavola M. L. et al. Nephelometric and turbidometric assays of cellulase activity // Anal. Biochem. — 1981. — V. 116. — P. 133–136.
65. Marsh C. B., Merola G. V., Simpson M. E. Experiments with an alkali swelling-centrifuge test applied to cotton fiber // Text. Res. J. — 1953. — V. 23. — P. 831.
66. Lee Y. J., Kim B. K., Lee B. H. et al. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull // Biores. Technol. — 2008. — V. 99, N2. — P. 378–386.
67. Bischoff K. M., Rooney A. P., Li X. L. et al. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis* // Biotechnol. Lett. — 2006. — V. 21. — P. 1761–1765.
68. Hirasawa K., Uchimura K., Kashiwa M. et al. Salt-activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* // Antonie Van Leeuwenhoek. — 2006. — V. 89, N2. — P. 211–219.
69. Voget S., Steele H. L., Streit W. R. Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase // J. Biotechnol. — 2006. — V. 126, N1. — P. 26–36.
70. Manikandan K., Jagtap S., Rao M., Ramakumar S. Crystallization and preliminary X-ray characterization of a thermostable low-molecular-weight 1,4-beta-D-glucan glucohydrolase from an alkalithermophilic *Thermomonospora* sp. // Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun. — 2006. — V. 62, Pt. 4. — P. 385–387.
71. Chaabouni S. E., Mechichi T., Limam F. et al. Purification and characterization of two low molecular weight endoglucanases produced by *Penicillium occitanis* mutant Pol 6 // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2005. — V. 125, N2. — P. 99–112.
72. Bronnenmeier K., Rucknagel K. P., Staudenbauer W. L. Purification and properties of a novel type of exo-1,4-beta-glucanase (avicelase II)

- from the cellulolytic thermophile *Clostridium stercorarium* // Eur. J. Biochem. — 1991. — V. 200, N2. — P. 379 — 385.
73. El-Gindy A. A., Saad R. R., Fawzi E. Purification and some properties of exo-1,4-beta-glucanase from *Chaetomium olivaceum* // Acta Microbiol. Pol. — 2003. — V. 52, N1. — P. 35–44.
 74. Sanchez M. M., Pastor F. I., Diaz P. Exo-mode of action of cellobiohydrolase Cel48C from *Paenibacillus* sp. BP-23. A unique type of cellulase among Bacillales // Eur. J. Biochem. — 2003. — V. 270, N13. — P. 2913–2919.
 75. Valaskova V., Baldrian P. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus* — production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases // Microbiology. — 2006. — V. 152, Pt. 12. — P. 3613–3622.
 76. Seidle H. F., Marten I., Shoseyov O., Huber R. E. Physical and kinetic properties of the family 3 beta-glucosidase from *Aspergillus niger* which is important for cellulose breakdown // Protein J. — 2004. — V. 23, N1. — P. 11–23.
 77. Ogura J., Toyoda A., Kurosawa T. et al. Purification, characterization, and gene analysis of cellulase (Cel8A) from *Lysobacter* sp. IB-9374 // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2006. — V. 70, N10. — P. 2420–2428.
 78. Sapre M. P., Jha H., Patil M. B. Purification and characterization of a thermostable-cellulase free xylanase from *Syncephalastrum racemosum* Cohn. // J. Gen. Appl. Microbiol. — 2005. — V. 51, N6. — P. 327–234.
 79. Grishutin S. G., Gusakov A.V., Markov A.V. et al. Specific xyloglucanases as a new class of polysaccharide-degrading enzymes // Biochim. Biophys. Acta. — 2004. — V. 1674, N3. — P. 268–281.
 80. Бухтояров Ф. Е., Устинов Б. Б., Саланович Т. Н. и др. Целлюлазный комплекс гриба *Chrysosporium lucknowense*: выделение и характеристика эндоглюканаз и целлобиогидролаз // Биохимия. — 2004. — Т. 69, № 5. — С. 666–677.
 81. Столбова В. В. Целлюлазы термофильных анаэробных бактерий : (Биосинтез, выделение, свойства) Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — 1994. — 20 с.
 82. Qi M., Jun H.-S., Forsberg C. W. Characterization and synergistic interactions of *Fibrobacter succinogenes* glycoside hydrolases // Appl. Environ. Microbiol. — 2007. — V. 73, N19. — P. 6098–6105.
 83. Thongekkaew J., Ikeda H., Masaki K., Iefuji H. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris* // Protein Expr. Purif. — 2008. — V. 60, N2. — P. 140–146.
 84. Nozaki K., Seki T., Matsui K. et al. Structure and characteristics of an endo-beta-1,4-glucanase, isolated from *Trametes hirsuta*, with high degradation to crystalline cellulose // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2007. — V. 71, N10. — P. 2375–2382.
 85. Kim H. W., Takagi Y., Hagihara Y., Ishikawa K. Analysis of the putative substrate binding region of hyperthermophilic endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii* // Biosci. Biotechnol. Biochem. — Ibid. — P. 2585–2587.
 86. Beukes N., Pletschke B. I. Effect of sulfur-containing compounds on *Bacillus* cellulosome-associated CMCase and Avicelase activities // FEMS Microbiol. Lett. — 2006. — V. 264, N2. — P. 226–231.
 87. Magalhaes P. O., Ferraz A., Milagres A. F. Enzymatic properties of two beta-glucosidases from *Ceriporiopsis subvermispora* produced in biopulping conditions // J. Appl. Microbiol. — 2006. — V. 101, N2. — P. 480–486.
 88. Sul O. J., Kim J. H., Park S. J. et al. Characterization and molecular cloning of a novel endoglucanase from *Trichoderma* sp. C-4 // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2004. — V. 66, N1. — P. 63–70.
 89. Yun S. I., Jeong C. S., Chung D. K. et al. Purification and some properties of a beta-glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4 // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2001. — V. 65, N9. — P. 2028–2032.
 90. Lynd L. R., Weimer P. J., van Zyl W. H. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2002. — V. 66, N3. — P. 506–577.

**ЦЕЛЛЮЛОЗОДЕГРАДИРУЮЩИЕ
СИСТЕМЫ МИКРООРГАНИЗМОВ:
БИОСИНТЕЗ, СВОЙСТВА
И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ
ОСОБЕННОСТИ**

Н. В. Борзова, Л. Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии
НАН Украины, Киев

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Обзор посвящен энзиматическим системам микроорганизмов, которые обеспечивают биодegradацию целлюлозы. Рассмотрены вопросы классификации эндо-, экзоглюканаз и β -глюкозидаз, регуляции их биосинтеза в микробной клетке, биохимических свойств, а также условий выделения и очистки. Особое внимание уделено сравнению целлюлозодеградирующих систем аэробных и анаэробных микроорганизмов, их структурным и функциональным особенностям. Приведены современные данные о возможных механизмах биодеструкции целлюлозы.

Ключевые слова: целлюлазы, деградация целлюлозы, свойства, структура и функции целлюлаз, механизм действия.

**THE CELLULOSE DEGRADING
SYSTEMS OF MICROORGANISMS:
BIOSYNTHESIS, PROPERTIES,
STRUCTURAL AND FUNCTIONAL
CHARACTERISTICS**

N. V. Borzova, L. D. Varbanets

Institute of Microbiology and Virology of
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Enzyme systems of microorganisms that provide biodegradation of cellulose are discussed. Particular attention is given to endo-, exoglucanases, and β -glucosidases classification, its biosynthesis regulation in microbial cells, biochemical properties and isolation and purification procedures as well. The review is focused on cellulose degrading systems of aerobe and anaerobe microorganisms, their structure and functional characteristics. Data concerning possible mechanism of cellulose destruction are discussed.

Key words: cellulase, degradation of cellulose, properties, structure and function of cellulases, mechanism of action.