Q 355
4.

ეროვნული
ბიბლიოთეკა

ეროვნული ბიბლიოთეკა

საქართველოს მეცნიერებათა აკადემია
ს.დურმიშიძის სახელობის მცენარეთა ბიოქიმიის ინსტიტუტი

ხელნაწერის უფლებით

ედიშერ გიორგის-ძე კვესიტაძე

თერმოფილური და მეზოფილური მიცელალური სოკოების ენდოგლუკანაზები

03.02.02 - ბიოქიმია
03.02.04 - ბიოტექნოლოგია

დისერტაცია წარდგენილია ბიოლოგიის მეცნიერებათა
დოქტორის სამეცნიერო ხარისხის მოსაპოვებლად

თბილისი-1994წ

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ს ა რ ჩ ე ვ ი

	გვერდი
გამოყენებული შემოკლებანი	4
შესავალი	5
ლიტერატურის მიმოხილვა	10
I სოკოური წარმოშობის თერმომედეგი ცელულაზები	10
1.1 თერმომედეგი ფერმენტები	10
1.2 თერმოფილური მიკროორგანიზმების ცელულაზები	23
II კვლევის მასალები და მეთოდები	43
2.1 ცელულაზრბის პროდუცენტი მიცელალური სოკოების შტამები, საკვები არეები და კულტივირების პირობები	43
2.2 ცელულაზების ტექნიკური პრეპარატის მიღება	44
2.3 ენდო-1,4-β-გლუკანაზური აქტივობის განსაზღვრა	44
2.4 ციღის რაოდენობის განსაზღვრა	45
2.5 ფერმენტების თერმომედეგობის შესწავლა	45
2.6 აფინური და იონცვლადი ქრომატოგრაფია	46
2.7 SDS-გელ ელექტროფორეზი	46
2.8 იზოელექტროფოკუსირება	47
2.9 ულტრაფილტრაცია	47
2.10 იმუნოქიმიური ანალიზი	48
2.11 ენდო-1,4-β-გლუკანაზის აქტივობის განსაზღვრა ზიმოგრამულად	48
2.12 ქსილანაზური აქტივობის განსაზღვრა	49
2.13 A.niger-ის კულტივირება და გლუკოზოოქსიდაზის გამოყოფა	49
2.14 გლუკოზოოქსიდაზური აქტივობის განსაზღვრა	50
2.15 პროტოპლასტების შერწყმა	51

ეროვნული ბიბლიოთეკა

III კვლევის შედეგები და მათი განხილვა.....52

3.1 Trichoderma reesei-ს მინორული თერმომედეგი
და ძირითადი ენდოგლუკანაზების გამოყოფა და შესწავლა.....52

3.2 თერმომედეგ ენდოგლუკანაზების პროდუცენტ თერმოფილური
მიცელალური სოკოების შერჩევა.....65

3.3 A.terrestris-დან თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის გამოყოფა
და შესწავლა.....95

3.4 სელექციურად შერჩეული A.niger-ის კულტურიდან
გლუკოზოოქსიდაზის გაწმენდა და მახასიათებლების დადგენა.....106

3.5 მიცელალური სოკოების A.terrestris-ის და A.niger-ის
პროტოპლასტების შერწყმა.....108

IV შედეგების განხილვა.....115

დასკვნები.....135

ციტირებული ლიტერატურა.....138

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ნაშრომში გამოყენებული შემოკლებანი

PEG - პოლიეთილენგლიკოლი

HEPES - N-[2-ჰიდროქსიეთილ]პიპერაზინ-N'-[2-ეთანსულფონ მჟავა]

pI, IEP - იზოელექტრული წერტილი

pNp - პარანიტროფენილლაქტოზიდი

Xyl - ქსილანი

EG - ენდოგლუკანაზა

DEAE - დიეთილამინოეთილი

CBH - ცელობიოჰიდროლაზა

ფ.ქ. - ფილტრის ქაღალდი

MW - მოლეკულური წონა

IEF - იზოელექტროფოკუსირება

მკც - მიკროკრისტალური ცელულოზა

კმც - კარბოქსიმეთილ ცელულოზა

SDS - ნატრიუმის დოდეცილსულფატი

ეროვნული ბიბლიოთეკა

შ ე ს ა ვ ა ლ ი

მეოცე საუკუნის მეორე ნახევარი მეცნიერების ისტორიაში შევა როგორც ბიოლოგიის განვითარების ყველაზე ინტენსიური პერიოდი. სწორედ ამ დროს ჩამოყალიბდა ბიოლოგიაში მთელი რიგი ახალი მიმართულებები: მოლეკულური ბიოლოგია, მოლეკულური გენეტიკა, გენეტიკური ინჟინერია, ენზიმური ინჟინერია, ბიოტექნოლოგია. ყოველივე ამას საფუძვლად დაედო ის წარმატებები, რომლებიც მიღწეული იქნა სხვადასხვა ორგანიზმების და მათ შორის მიკროორგანიზმების შესწავლაში. მიკროორგანიზმებს იმიტომ ესმება ხაზი, რომ სწორედ ამ ორგანიზმების მეშვეობით იქნა მიღწეული თითქმის ყველა მნიშვნელოვანი აღმოჩენა ბიოლოგიაში.

მიკროორგანიზმები მორფოლოგიურად დიდად არ განსხვავდებიან სხვა ცოცხალი ორგანიზმებისაგან, მაგრამ მიუხედავად ამისა, მათ შესწევთ უნარი იარსებინ გაცილებით უფრო მკაცრ ექსტრემალურ პირობებში, ვიდრე სხვა ორგანიზმებს. პირველ რიგში ეს აიხსნება მათი გაცილებით სწრაფი ადაპტაციის უნარით. რა თქმა უნდა, სხვადასხვა ტაქსონომიური ჯგუფების მიკროორგანიზმები შერჩევით ეგუებიან ექსტრემალურ პირობებს. ექსტრემალურ პირობებს მიეკუთვნებიან: მაღალი ტემპერატურა, გარემოს მაღალი ან დაბალი მჟავიანობა, მარილების მაღალი კონცენტრაცია, მაღალი წნევა, რადიაციის მაღალი ინტენსივობა, მძიმე მეტალების მაღალი კონცენტრაცია. მიკროორგანიზმებს, რომლებიც აღნიშნულ პირობებს ეგუებიან და უფრო მეტიც, მათთვის ეს პირობები ოპტიმალურს წარმოადგენენ, ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმები ეწოდათ. დღეისათვის ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმების გამოყოფა და შესწავლა დიდ ყურადღებას იპყრობს, რამეთუ ინტერესს წარმოადგენს როგორც თეორიული, ასევე პრაქტიკული თვალსაზრისით.

თუ ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმების შესწავლის თეორიული ინტერესი ძირითადად სიცოცხლის "საზღვრების" დადგენასთან, უჯრედის განსაკუთ-

ეროვნული ბიბლიოთეკა

რებულ შემადგენლობასთან და მის ორგანიზაციასთან არის დაკავშირებული. პრაქტიკული ინტერესი შემდეგში მდგომარეობს, ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმები წარმოქმნიან სტაბილურ ფერმენტების წყაროს, ყველაზე ხშირად სწორედ იმ პირობისადმი, რომელშიც იზრდებიან. სწორედ სტაბილური ფერმენტები, რომელთაც უნარი შესწევთ იმოქმედონ კრიტიკულ პირობებში და ამით მინიმუმამდე დაიყვანონ სხვა ყველა შესაძლო რეაქციების მსვლელობა, ძალზედ დიდ ინტერესს წარმოადგენენ თანამედროვე ბიოტექნოლოგიისათვის.

ბუნებაში მცენარეული სუბსტრატების დაშლაში მონაწილეობას იღებენ სხვადასხვა საპროფიტული მიკროორგანიზმები, რომლებიც არათანაბრად შლიან სხვადასხვა მცენარეულ კომპონენტებს (1). აღიარებულია, რომ ამ პროცესში მიცელიალურ სოკოებს განსაკუთრებული ადგილი უჭირავთ იმის გამო, რომ მათ გააჩნიათ მცენარეული კომპონენტების დამშლელი ფერმენტების წარმოქმნის ფართო გენეტიკური სპექტრი. გარდა ამისა, მიცელიალური ორგანიზაცია ანიჭებს, ამ კლასის მიკროორგანიზმებს, მაღალი შეღწევადობის უნარს ყველა სახის მცენარეულ სუბსტრატში, რაც ძალზედ მნიშვნელოვანს ხდის მათი გამოყენების პერსპექტივას.

ცელულოზა დედამიწაზე ყველაზე ფართოდ გავრცელებული სუბსტრატია. ამის დამადასტურებლად საკმარისია ითქვას, რომ მისი ყოველწლიურად განახლებადი მასა შეადგენს დაახლოებით 150 მილიარდ ტონას (2). ცხადია, რომ ამ სუბსტრატის რაციონალურ გამოყენებას დიდი მნიშვნელობა ენიჭება. ისიც უნდა აღინიშნოს, რომ ცელულოზა გლუკოზის მონომერებისაგან შედგება და თუ მოხერხდებოდა ცელულოზის ჰიდროლიზის პროცესის დამუშავება ისე, რომ მიგვეღო საკვები ღირებულების გლუკოზა, რა თქმა უნდა, ეს დიდი წვლილი იქნებოდა ჩვენი პლანეტის სასურსათო პრობლემის გადაწყვეტაში.

ცელულოზის ჰიდროლიზის ორი ალტერნატიული გზა არსებობს, პირველი მდგომარეობს მის ჰიდროლიზში მინერალური მჟავეებით, მეორე ითვალისწი-

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ნებს მიკრობული წარმოშობის ფერმენტებით დაშლას. როგორც პრაქტიკა გვიჩვენებს, მინერალური მჟავეებით ცელულოზის ჰიდროლიზი გამოიყენება მხოლოდ ტექნიკური მიზნებისათვის (3).

80-იან წლებში მიაჩნდათ, რომ ფერმენტული გზით მოხერხდებოდა ცელულოზიდან საკვები ღირებულების გლუკოზის მიღება. ამ პრობლემაზე მსოფლიოს ბევრ სამეცნიერო ცენტრში მუშაობდნენ, მაგრამ აღნიშნულმა მიდგომამ არ გაამართლა, მცირეოდენი გამონაკლისის გარდა, რაც ბევრი მიზეზით აიხსნება, რომელთა შორის ერთ-ერთი ძირითადი ფერმენტების ლაბილურობა გახლავთ. მას შემდეგ, რაც დადგინდა, რომ ზოგ ექსტრემოფილურ მიკროორგანიზმებს უნარი შესწევთ მოახდინონ ცელულაზების სინთეზი (4) ინტერესი ცელულოზის ფერმენტული ჰიდროლიზისადმი კვლავ დიდი ყურადღების ცენტრში აღმოჩნდა. ცელულოზის ჰიდროლიზი, რომელიც რამოდენიმე დღე-ღამეს გრძელდება ცალკეულ შემთხვევებში, აუცილებლად მოითხოვს სტაბილური ფერმენტის მონაწილეობას რეაქციაში. გარდა ამისა შესაძლო ბაქტერიული დაბინძურების თავიდან ასაცილებლად ან მინიმუმამდე დასაყვანად ცელულოზის დაშლა 65°C-ზე (პასტერიზაციის ტემპერატურა) მაინც უნდა მიმდინარეობდეს. სწორედ ამიტომ თერმომედეგი ეუკარიოტული და პროკარიოტული ცელულაზების აღმოჩენამ ხელახალი ძლიერი იმპულსი მისცა ამ ტექნოლოგიის დამუშავებას.

როგორც ვარაუდობენ ბუნებაში მიმდინარე მიკრობიოლოგიური გარდაქმნების მხოლოდ 30-40% თუ არის ცნობილი მეცნიერებისათვის. გაცილებით უფრო მეტად მოკლებულია ჭეშმარიტებას ჩვენს ხელთ არსებული ინფორმაცია ექსტრემოფილური მიკროორგანიზმების შესაძლებლობებზე. ამ უკანასკნელ ხანებში სულ ახალი და ხშირად წარმოუდგენელი ინფორმაცია ვრცელდება მათგან გამოყოფილი საოცრად მედეგი ცილების (ფერმენტების) თვისებებზე. ყოველივე ეს იძლევა საშუალებას ჩამოყალიბდეს პრინციპულად ახალი ტექნოლოგიები, გაცილებით მაღალი ეკონომიური ეფექტურობით.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

წარმოდგენილი სამუშაო, რომელიც შესრულებულია 1986-1994 წლებში ძირითად ამოცანად ისახავდა: შეგვეჯამებინა თერმომედეგი ცელულაზების მიღებასთან და შესწავლასთან დაკავშირებით ჩატარებული კვლევები; შეგვემოწმებინა, როგორც მეზოფილური ისე თერმოფილური მიცელიალური სოკოების პოტენციალი ცელულაზების თერმომედეგობაზე; გამოგვევლინა და შეგვესწავლა თვითოეული თერმომედეგი ფორმა და შეგვეფასებია მათი პრაქტიკული გამოყენების მიზანშეწონილობა; რეკომენდაცია გაგვეწია შერჩეული შტამების კონკრეტული პრაქტიკული გამოყენებისათვის.

<u>ნაშრომის მეცნიერული სიახლე.</u> ნაშრომის მეცნიერული სიახლე მდგომარეობს მიცელიალური სოკოების ენდოგლუკანაზების თერმომედეგობის სისტემატურ შესწავლაში და მიღებული შედეგების განზოგადოებაში.

მეზოფილურ მიცელიალურ სოკოებში (**Trichoderma reesei**) არსებული ზომიერ თერმომედეგ უჯრედგარე ენდოგლუკანაზასთან ერთად აღმოჩენილია მინორული, თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის ფორმა.

შესწავლილია თერმოფილური სოკოების მაღალი ტემპერატურის მიმართ ადაპტაციის უნარი. შერჩეულია კულტურა **Allesheria terrestris**-ი, როგორც ცელულაზების შემცველ საკვებ არეზე, ყველაზე მაღალ ტემპერატურულ რეჟიმში (48-49°) მზარდი ორგანიზმი. დადგენილია აგრეთვე, რომ იგივე კულტურა 60-62° პირობებში კარგად იზრდება ისეთ ადვილად მეტაბოლიზირებად სუბსტრატზე, როგორიც გლუკოზაა. ნაჩვენებია, რომ 48-49°-ზე კულტურა წარმოქმნის სუპერთერმომედეგ ენდოგლუკანაზას, რომელიც ტემპერატურული მდგრადობით აღემატება ყველა დღემდე ცნობილ სოკოვანი წარმოშობის ენდოგლუკანაზას. **Allesheria terrestris**-ის კულტივირებისას 35°-ზე, სუპერთერმომედეგი ენდოგლუკანაზა არ წარმოიქმნება, 40°-ზე იგი დეტექტირებადია და მაქსიმუმს 48-49°-ის პირობებში აღწევს.

აფინური, იონცვლადი ქრომატოგრაფიის, გელფილტრაციის და პრეპარატული ელექტროფორეზის მეთოდების გამოყენებით ჰომოგენურ მდგომარეობაში

ეროვნული ბიბლიოთეკა

მიღებულია შვიდი ჯიშობრივად განსხვავებული მიცელალური სოკოების ენდოგლუკანაზა: T.reesei-დან ზომიერად თერმომედეგი და მინორული თერმომედეგი, A.terrestris-იდან სუპერთერმომედეგი და Agaricus bisporus-იდან ენდოგლუკანაზის ოთხი ელექტროფორეზულად განსხვავებული ფორმა. შესწავლილია ამ ფერმენტების ძირითადი თვისებები; ნაჩვენებია, რომ ისინი ერთმანეთისაგან მნიშვნელოვნად განსხვავდებიან მხოლოდ თერმომედეგობით.

თერმოფილური A.terrestris და მეზოფილური Aspergillus niger-ის კულტურებიდან გამოყოფილი პროტოპლასტების შერწყმით მიღებულია ფუზანტი, რომელიც ხასიათდება ორივე მშობლიური კულტურის დამახასიათებელი თვისებებით, და ამავე დროს განსხვავდება მათგან.

ნაშრომის პრაქტიკული ღირებულება. ჩატარებული სამუშაოს შედეგად დადგენილია, მიცელალურ სოკო Allesheria terrestris-ის კულტურაში სუპერთერმომედეგი ენდოგლუკანაზის არსებობა, რომლის გამოყენებაც სავსებით შესაძლებელია სუბსტრატების ხანგრძლივი ჰიდროლიზისას 65-70° პირობებში. აღნიშნული ფერმენტისადმი სპეციფიური გენი კარგ ობიექტს წარმოადგენს სხვა მიკროორგანიზმებში კლონირების თვალსაზრისით.

სელექციურად შერჩეულია მეზოფილური Aspergillus niger-ის კულტურა როგორც უჯრედშიდა გლუკოზოოქსიდაზის აქტიური პროდუცენტი. ამ კულტურის პროტოპლასტების შერწყმით თერმოფილური Allesheria terrestris-დან გამოყოფილ პროტოპლასტებთან მიღებულია ფუზანტი, რომელიც დედა კულტურა A.niger-თან შედარებით, ხასიათდება ორჯერ უფრო მაღალი გლუკოზოოქსიდაზური აქტივობით. აღნიშნული ექსპერიმენტალურად მიღებული კულტურა გამოიყენება გლუკოზოოქსიდაზის სამრეწველო მასშტაბით მისაღებად.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ლ ი ტ ე რ ა ტ უ რ ი ს მ ი მ ო ხ ი ლ ვ ა

I თ ა ვ ი

სოკოური წარმოშობის თერმომედეგი ცილოლაზები

1.1. თერმომედეგი ფერმენტები

ეჭვს გარეშეა, რომ ცილების თერმომედეგობისა ან თერმოლაბილურობის ნებისმიერი დონე მთლიანად დეტერმინირებულია ცილის პირველადი, მეორეული და მესამეული სტრუქტურებით (5,6).

თერმომედეგი ფერმენტების მიმართ ინტერესი განპირობებულია ორი ძირითადი ფაქტორით: მათი პრაქტიკული გამოყენების შესაძლებლობით და თერმომედეგობის გამომწვევი მიზეზების ახსნით. წარმოდგენილ ნაშრომში, ჩვენ შევეცადეთ მოგვეცვა თერმომედეგი ფერმენტების შესაძლო გამოყენების სფეროები მრეწველობაში და ყურადღება ძირითადში გადაგვეტანა ცილებზე, რომლებიც განაპირობებენ მათ მაღალ თერმომედეგობას.

როგორც წესი ცილების მედეგობა მაღალი ტემპერატურის მიმართ, წარმოადგენს იმ ფაქტორთა ანაკრებს, რომელთა ჯამი ახდენს ცილოვანი გლობულის შიგა და გარე ფენებში განლაგებული ჯაჭვების სტრუქტურის განმტკიცებას, (7-9). ასეთ ფაქტორებს მიეკუთვნებიან: წყალბადური ბმები (10,11), მეტალის იონები (12-16), ჰიდროფობული და ჰიდროფილური ურთიერთქმედებანი (9,17-19), ამინომჟავური შედგენილობა, დისულფიდური ბმები (20,21) და ა.შ. ამრიგად, ხშირად, მაღალი თერმომედეგობა არ წარმოადგენს რომელიმე ერთი ფაქტორის მოქმედების შედეგს, იგი არის მასტაბილიზებელი ფაქტორების კომბინაცია. დღემდე არსებული მონაცემებიდან, ცილოვანი გლობულის სტაბილიზაციის ენერგია (ΔG) არ აღემატება 80 კკალ/მოლ (10,22). მიუხედავად იმისა, რომ აღნიშნული ენერგიის რაოდენობა (ΔG) ძალზედ მცირეა, იგი ზოგიერთ შემთხვევაში ცილის საგრძნობ

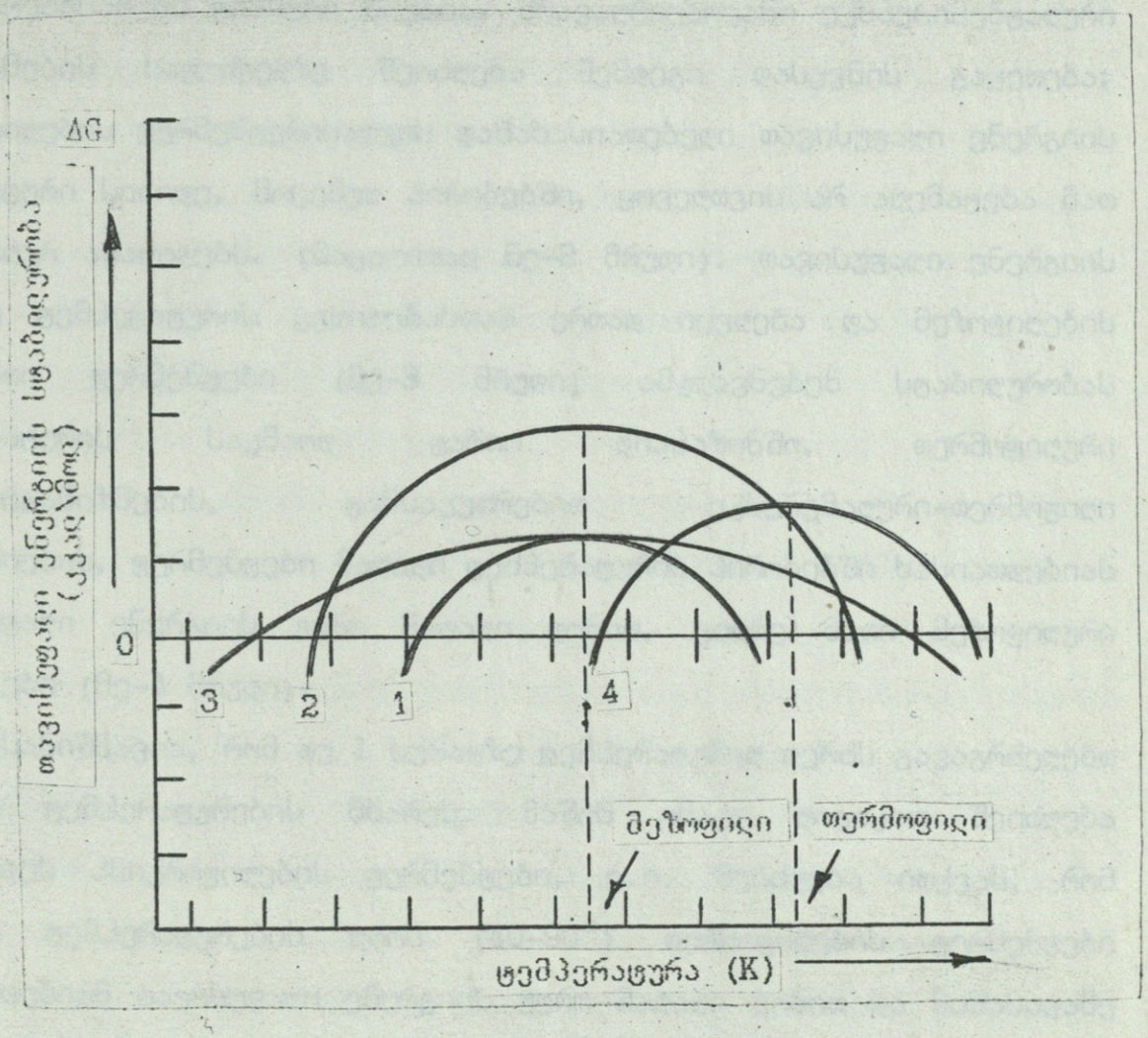
ეროვნული ბიბლიოთეკა

სტაბილიზაციას იწვევს. სწორედ ამით აიხსნება ის ფაქტი, რომ მთელ რიგ შემთხვევებში, ტემპერატურის, არის pH-ის, გამხსნელების სისტემების, უმნიშვნელო ცვლილებები იწვევენ ცილის გლობულის დესტაბილიზაციას, ცვლიან ძალთა ბალანს, ზრდიან კონფორმაციულ ენტროპიას და ხშირად იწვევენ ცილის უკუუქცევად დენატურაციას.

თერმოფილების და მეზოფილების ერთი და იგივე ფერმენტები, ალბათ უნდა წარმოადგენდნენ შედარებით ხელსაყრელ მოდელს იმ მიზეზების დასადგენად, რომლებიც განაპირობებენ მათ მაღალ თერმომედეგობას. ლიტერატურაში არ არსებობს მონაცემები იმის შესახებ, რომ თერმოფილური მიკროორგანიზმების ფერმენტები გაზრდილი თერმომედეგობასთან ერთად ხასიათდებოდნენ სუბსტრატების გარდაქმნის უფრო მაღალი სიჩქარით. უმეტეს შემთხვევაში თერმოფილების ფერმენტები, გარდა გაზრდილი თერმომედეგობისა, მცირეოდენათ თუ განსხვავდებიან მეზოფილური ანალოგებისაგან (23,24). ფიზიოლოგიური თვალსაზრისით, მიკროორგანიზმები სამ ძირითად კლასად შეიძლება დაიყოს: ფსიქროფილები, მეზოფილები და თერმოფილები. ფსიქროფილები დაბალ ტემპერატურაზე იზრდებიან (-10დან +40°მდე) და ყველაზე ნაკლებად თერმომედეგ ცილებს წარმოქმნიან. მეზოფილური ორგანიზმები ჩვეულებრივ პირობებში იზრდებიან (10-დან 35°-მდე). მათ მიერ სინთეზირებული ცილები განსაკუთრებული თერმომედეგობით არ ხასიათდებიან, ძალზედ იშვიათი გამონაკლისის გარდა. თერმოფილური ორგანიზმები, როგორც ეუკარიოტები, და განსაკუთრებით პროკარიოტები ცნობილნი არიან როგორც ყველაზე თერმომედეგი ცილების წყარო. რა თქმა უნდა ეს არ უნდა გავიგოთ ისე, თითქოს ყველა ცილა მიღებული თერმოფილური მიკროორგანიზმებიდან, ხასიათდება მაღალი თერმომედეგობით. თერმომედეგი ფერმენტები უფრო ხშირად არიან უჯრედგარეშე ფერმენტები (24). მიუხედავად იმისა, რომ თერმომედეგი ცილების/ფერმენტების გამომწვევი მიზეზები ჯერჯერობით მთლიანად შესწავლილი არ არის, დაგროვილია დიდძალი ექსპერიმენტული მასალა, რომელიც

ეროვნული ბიბლიოთეკა

იძლევა საშუალებას გამოვლინდეს თერმომედეგი ცილების მთელი რიგი თავისებურებანი. დიდი რაოდენობის ექსპერიმენტული მონაცემების ანალიზის საფუძველზე წამოყენებულია ორი სხვადასხვა ტიპის თერმომედეგობის არსებობის შესაძლებლობა (1 სურ.).



სურ.1 მეზოფილური და თერმოფილური მიკროორგანიზმების ფერმენტების თავისუფალი ენერგიის (ΔG) სტაბილურობის დამოკიდებულება ტემპერატურისაგან 1,2,3,-მეზოფილური მიკროორგანიზმების ფერმენტებისათვის დამახასიათებელი მრუდეები. 4-თერმოფილური მიკროორგანიზმების ფერმენტებისათვის დამახასიათებელი მრუდი.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

1 სურათზე ნაჩვენები მრუდები ასახავენ თავისუფალი ენერგიის სიდიდის ცვლილებას მზარდი ტემპერატურული ღერძის გასწვრივ. 1,2 და 3 მრუდები მეზოფილური მიკროორგანიზმების ფერმენტებს ისაევის დამახასიათებელი, ხოლო მე-4 - თერმოფილური მიკროორგანიზმის ფერმენტებისათვის ტიპიური მრუდია. მრავალრიცხოვანი ექსპერიმენტალური მონაცემების საფუძველზე შეიძლება შემდეგი დასკვნის გაკეთება: თერმოფილების ფერმენტებისათვის დამახასიათებელი თავისუფალი ენერგიის აბსოლუტური სიდიდე, მოცემულ პირობებში, ყოველთვის არ აღემატება მათ მეზოფილურ ანალოგებს. (მაგალითად მე-2 მრუდი). თავისუფალი ენერგიის სიდიდე ტემპერატურის ცვლილებასთან ერთად იცვლება და მეზოფილების ზოგიერთი ფერმენტები (მე-3 მრუდი) ამჟღავნებენ სტაბილურობას ტემპერატურის საკმაოდ ფართო დიაპაზონში. თერმოფილური მიკროორგანიზმების, განსაკუთრებით ექსტრემალური-თერმოფილი ბაქტერიების, ფერმენტები მაღალი ტემპერატურის პირობებში ხასიათდებიან თავისუფალი ენერგიის უფრო მაღალი დონით, ვიდრე მათი მეზოფილური ანალოგები (მე-4 მრუდი).

აღსანიშნავია, რომ თუ 1 სურათზე ტემპერატურულ ღერძს გავაგრძელებთ დაბალი ტემპერატურების მხარეს, მაშინ იმავე ლოგიკით შეიძლება მოთავსდეს პსიქროფილების ფერმენტები, ე.ი. შეიძლება ითქვას, რომ მაღალი ტემპერატურების დროს (40-90°) თერმოფილების ფერმენტები ხასიათდებიან თავისუფალი ენერგიის უფრო მაღალი დონით და მაშასადამე მაღალი სტაბილურობით. საშუალო და ზომიერი (10-45°) ტემპერატურებისას იმავე მიზეზით უფრო (ან არანაკლებად) სტაბილურია მეზოფილების ფერმენტები, ხოლო დაბალი ტემპერატურების შემთხვევაში (-60-0°) - ფსიქროფილების ფერმენტები, რაც კორელაციაშია პროდუცენტების ბუნებრივ გერემოცვასთან. თერმოფილების, მეზოფილების და ფსიქროფილების თერმომედეგი ფერმენტების დიდი უმრავლესობა თავსდება ზემოთ მოყვანილი

ეროვნული ბიბლიოთეკა

მსჯელობის ჩარჩოებში.

საკმაოდ ზუსტ მეთოდს, რომელიც ახდენს ცილოვანი მოლეკულის კონფორმაციული თერმომედეგობის, დეტექტირებას, წარმოადგენს სკანირებადი, დიფერენცირებადი მიკროკალორიმეტრიის მეთოდი. ამ მეთოდის გამოყენება საშუალებას იძლევა ცილოვანი გლობულის თერმოდეგრადაციის პროცესში მთელი რიგი თერმოდინამიური მახასიათებლების (ღღვობის ტემპერატურა, ენტალპიის ცვლილება, ენტროპია, თავისუფალი ენერგია) დადგენისა. ამის შედეგად მიღებული თერმული შთანთქმის მრუდები მონაცემებიდან გამომდინარე შეგვიძლია არა მარტო ვიმსჯელოთ ცილის გლობულის სტრუქტურის თერმოდინამიური სტაბილურობის შესახებ, არამედ მისი ცალკეული დომენების თერმომედეგობაზეც. (25,26).

მეზოფილებისა და თერმოფილების ერთი და იგივე ფერმენტებზე მიღებული ექსპერიმენტული მონაცემები საშუალებას იძლევიან გამოვლინდეს მათი ჰომოლოგიური ბუნება. უნდა აღინიშნოს, რომ ამ ფერმენტებს შორის დადგენილია მცირეოდენი განსხვავება სტრუქტურებში, რითაც განპირობებულია თერმოფილების ფერმენტების უფრო მაღალი თერმომედეგობა (27,29). ექსტრემალური თერმოფილების ფერმენტების შედარებით, მეზოფილურ ანალოგებთან, აღმოჩნდა რომ მათ გააჩნიათ დაახლოვებით 20°-ით მაღალი მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმი, ხოლო სხვაობა თავისუფალ ენერგიის სიდიდეებს (ΔG) შორის შეადგენს არა უმეტეს 7 კკალ/მოლ (10). ასეთი მცირე სხვაობა ცილის მოლეკულების თავისუფალ ენერგიებს შორის რა თქმა უნდა არ არის არსებითი და გამოისახება რაოდენობრივად ცილის მოლეკულაში დამატებით ერთ მარილის ან რამდენიმე წყალბადური ბმის არსებობით. ცხადია, რომ თერმოფილების ფერმენტების ამაღლებული თერმომედეგობა, შედარებით ჩვეულებრივ ფერმენტებთან არ მოითხოვს მნიშვნელოვან გენეტიკურ გარდაქმნას, რაც თერმოფილებისა და მეზოფილების ცილების სტრუქტურულ ჰომოლოგიას უმნიშვნელოდ ცვლის.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

მიუხედავად ამისა, თავისუფალი ენერგიის ასეთი მცირე მატებაც იწვევს ფერმენტების თერმომედეგობის საგრძნობ გაზრდას პრაქტიკული მიზნებისათვის.

ფაქტორები, რომლებიც განსაზღვრავენ ფერმენტების მაღალ თერმომედეგობას, გამოვლენილია როგორც თერმოფილურ, ასევე მეზოფილურ წარმოშობის ფერმენტებში. ასეთი ფაქტორები ლიტერატურაში აღწერილია საკმაო რაოდენობით. შემდგომში, განხილული იქნება ის ურთიერთქმედებანი და თვისებები, რომლებიც იწვევენ ცილების თერმომედეგობის გაზრდას.

იმ ფაქტორებს შორის, რომლებიც დამახასიათებელია როგორც თერმოფილების, ისე მეზოფილების თერმომედეგი ცილებისათვის, ერთ-ერთ მნიშვნელოვანს წარმოადგენს ჰიდროფობული ამინომჟავების მაღალი შემცველობა (7,29,30,31-33). როგორც ექსტრემალური თერმოფილური მიკროორგანიზმების განსაკუთრებით თერმომედეგ ფერმენტებზე მიღებულმა შედეგებმა გვაჩვენა, თითქმის ყოველთვის, მათთვის დამახასიათებელია ჰიდროფობური ამინომჟავების მკვეთრად მომატებული რაოდენობა (34). გამოითქვა საინტერესო აზრი იმის თაობაზე, რომ მედეგობისათვის ყოველთვის როდია საჭირო ჰიდროფობული ნაშთების დიდი რაოდენობა, არამედ აუცილებელია გლობულის შიგნით მათი სივრცული სიახლოვე (30), როცა ისინი მაქსიმალურად ამყარებენ მოლეკულას და ამით ამაღლებენ მის თერმომედეგობას.

ელექტროსტატიკური ურთიერთქმედება ანუ წყალბადური ბმების გაზრდილი რაოდენობა ფასდება, როგორც არსებითი ფაქტორი, რომელიც გავლენას ახდენს ფერმენტების თერმომედეგობაზე (10,35). ობლიგატური თერმოფილიდან გამოყოფილ პროტეინაზაში აღმოჩენილია ცხრამეტი დამატებითი წყალბადური ბმა მეზოფილურ ანალოგებთან შედარებით (36).

მრავალჯერ იქნა დამტკიცებული, რომ დისულფიდური ბმების არსებობა ზრდის ცილის მოლეკულის რეზისტენტულობას მაღალი ტემპერატურების მიმართ

ეროვნული ბიბლიოთეკა

(21,37). ალბათ ეს ფაქტორი ერთ-ერთ მნიშვნელოვნად უნდა ჩაითვალოს ცილის სტრუქტურის გამტკიცებაში ყველა ექსტრემალური პირობის მიმართ.

იმ ფაქტორების რიცხვს, რომლებიც ცალსახად განაპირობებენ ფერმენტების მედეგობას ნებისმიერი კრიტიკული პირობების მიმართ, შეიძლება მიეკუთვნოს აგრეთვე ფერმენტების მოლეკულაში იონურად, კოვალენტურად, კოორდინაციულად დაკავშირებული ორვალენტიანი მეტალების იონების არსებობა (15,17,38).

უკანასკნელ ხანს გამოქვეყნდა მრავალი ახალი მონაცემი ცილების თერმომედეგობაზე ამინომჟავური ნაშთების შესაძლებელი როლის შესახებ. ასე მაგალითად, ცისტეინი ადვილად იჟანგება და როგორც წესი ძალზედ იშვიათად გვხვდება თერმომედეგ ცილებში (29). რამდენიმე ნაშრომში ექსპერიმენტულად იყო დადგენილი, რომ თერმოფილებიდან გამოყოფილ ცილებში დაქვეითებულია ლიზინის, სერინის და ტრეონინის, ხოლო გაზრდილია არგინინის შემცველობა (5,6,18,19).

ვადლერის და სხვათა მონაცემებით (37) განხილულია მეზოფილური და თერმოფილური მიკროორგანიზმებიდან გამოყოფილი 200-ზე მეტი ჰომოლოგიური ცილა, გაკეთებულია მცდელობა ამინომჟაურ შემადგენლობაზე დაყრდნობით მათ სტრუქტურებში სხვაობის ახსნისა. რის შედეგადაც დადგენილია, რომ თერმომედეგობის გაზრდით იცვლება მათი ჰიდროფობულობის ინდექსი, იზრდება ARG/(ARG+LIS) შეფარდება. ლიტერატურაში ცნობილია სხვა მონაცემებიც ცილების თერმომედეგობის მატების ასახსნელად, სხვა ამინომჟავური ნაშთების შესაძლო როლის შესახებ, რომლებიც წარმოადგენენ უმთავრესად ჰიპოთეთურ დასკვნებს, სწორედ ამიტომ, ამ ნაშრომში მათ შესახებ მსჯელობა არ გვექნება. როგორც ჩანს, არ არის გამორიცხული სხვა ფაქტორებიც, რომელთაც წვლილი შეაქვთ ცილების მედეგობაში, თუმცა ექსტრემალური თერმოფილების ცილების ამაღლებული თერმომედეგობა სავსებით შეიძლება აიხსნას ზემოთ მოყვანილი ფაქტებითაც.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

დღეისათვის დაგროვილია მონაცემების დიდი რაოდენობა, რომლებიც ცალსახად მიუთითებენ თერმოფილური ორგანიზმების ფერმენტების ამაღლებულ თერმომედეგობაზე მეზოფილური მიკროორგანიზმების ფერმენტებთან შედარებით. იმის გამო, რომ წარმოდგენილ ნაშრომში ვერ მოვახერხებთ განვიხილოთ ამ საკითხთან დაკავშირებულ მრავალ ნაშრომს, შემოვისაზღვრებით მხოლოდ რამდენიმე მაგალითით, მოყვანილს 1 ცხრილში (39) და მე-2 სურათზე (40).

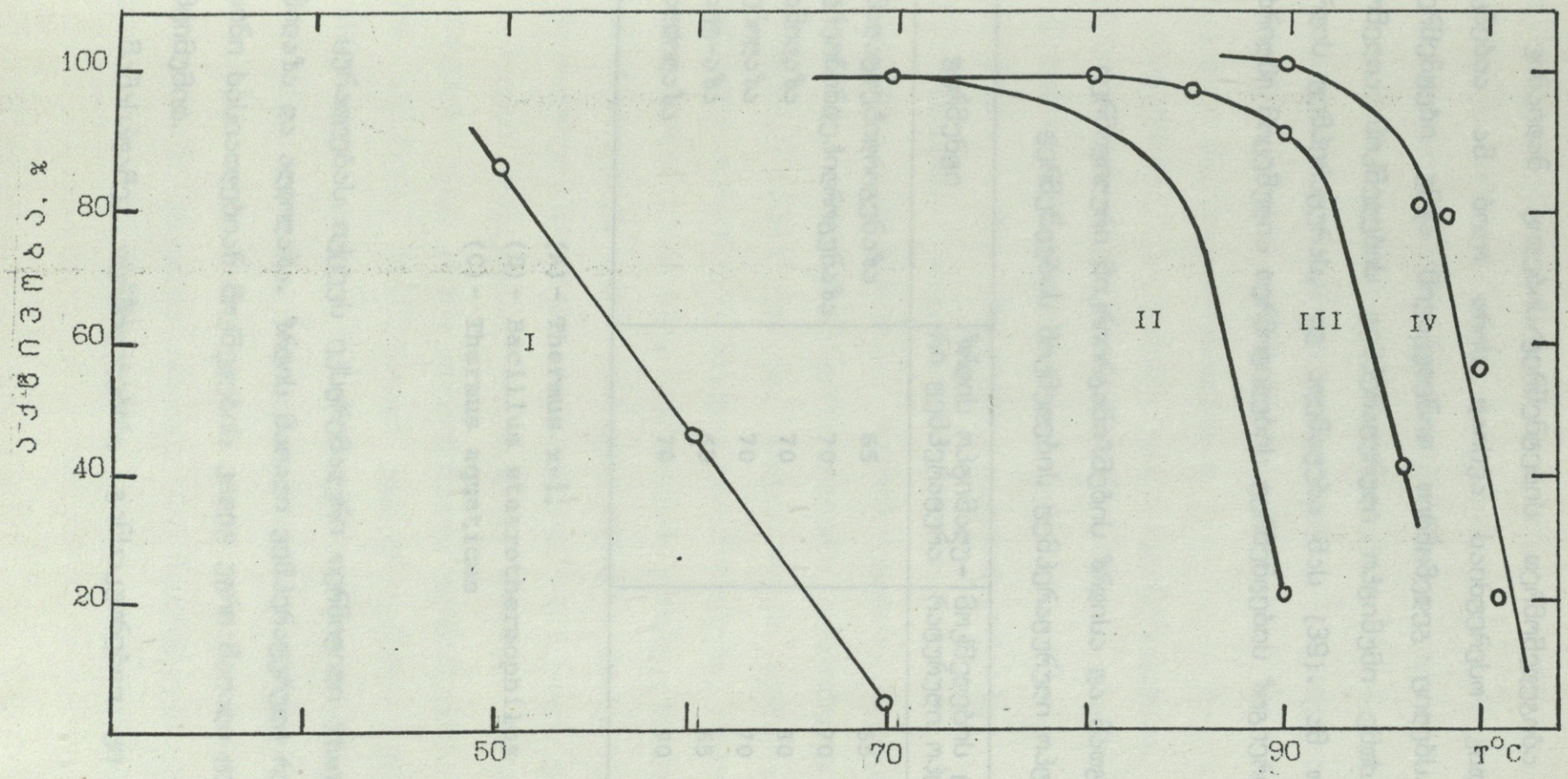
ცხრილი №1

თერმოფილური და მეზოფილური მიკროორგანიზმებიდან
გამოყოფილი ფერმენტების თერმომედეგობა

ფერმენტი	ტემპერატურა °C	ნახევრად ინაქტივაც. დრო (სთ) $\tau_{1/2}$	
		მეზოფილები	თერმოფილები
1. α-ამილაზა	90	0,005(A)	0,4(B)
2. 6-ფოსფოგლუკანატ-დეჰიდროგენაზა	50	0,06(C)	0,1(D)
3. იზოციტრატლიაზა	55	0,05(E)	0,5(B)
4. ასპარაგინაზა	55	0,3 (E)	1,4(D)

ორგანიზმები: (A) Bacillus subtilis, (B) Bacillus stearothermophilus, (C) Penicillum votatum, (D) Penicillium dupontii, (E) Pseudomonas indigofera, (F) Bacillus coagulans.

საქართველოს ეროვნული ბიბლიოთეკა



- მე-2 სურ. არათერმოფილური, ზომიერი და ექსტრემალურად თერმოფილური მიკროორგანიზმებიდან გამოყოფილი გლიცერალდეჰიდ-3-ფოსფატდეჰიდროგენაზის თერმოინაქტივაცია
I-არათერმოფილური მიკროორგანიზმი, II-ზომიერად თერმოფილი B.stearothermophilus, IV-ექსტრემალური თერმოფილი T.aguaticus. I,II,III-ინკუბაციის დრო 5წთ, IV-10წთ.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ვინაიდან ცილების/ფერმენტების თერმომედეგობა მაინც პირობითი მცნებაა ამ ბოლო დროს დაისვა საინტერესო კითხვა, თუ რომელი ფერმენტები უნდა მივაკუთვნოთ თერმომედეგ ცილებს. ის ფერმენტები რომელთა მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმი ემთხვევა პროდუცენტის ზრდის ტემპერატურას, თუ აღემატება მას (39). ამ თვალთახედვით მე-2 ცხრილში მოცემულია თერმოფილების ფერმენტების ზოგიერთი მონაცემები.

ცხრილი №2

თერმოფილური მიკროორგანიზმების ზრდისა და მათგან მიღებული ფერმენტების მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმები

ფერმენტი	ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურა	მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმი	პროდუცენტი
მალატდეჰიდროგენაზა	65	65	(B)
ტრეონინდეჰიდროგენაზა	70	70	(A)
ამიდაზა	70	80	(C)
ენოლაზა	70	70	(A)
ატფ-აზა	65	65	(B)
ალდოლაზა	70	90	(C)

(A)- Thermus x-1,
(B)- Bacillus stearothermophilus
(C)- Thermus aquaticus

ყურადღებას იქცევს ექსტრემალური თერმოფილი Thermus aquaticus-ის ამიდაზა და ალდოლაზა. ზრდის მაღალი ტემპერატურული რეჟიმის დროს (70°) ისინი ხასიათდებიან მოქმედების კიდევ უფრო მაღალი ტემპერატურული ოპტიმუმით.

მაშასადამე, თერმოფილების, განსაკუთრებით კი ექსტრემალური და

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ზღვრულ-ექსტრემალური თერმოფილების, ფერმენტების შემთხვევაში წარმოდგენა იმის შესახებ, რომ თერმომედეგ ფერმენტებს მიეკუთვნებიან ისინი თუ არა, მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმის და პროდუცენტის ზრდის ტემპერატურაზე დაყრდნობით, ეჭვს არ იწვევს. ამასთან ერთად, ლიტერატურაში აღწერილია დიდი რაოდენობით მეზოფილური მიკროორგანიზმების ფერმენტები, რომლებიც არ თავსდებიან ზემოთ მოყვანილი მსჯელობის ჩარჩოებში.

მაგალითად, საფუარები და აქტინომიცეტები, რომელთა ზრდის ტემპერატურული ოპტიმუმია 25-28°, ხშირად წარმოქმნიან ფერმენტებს მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმით 30-38°. ცხადია, რომ მსგავსი ფერმენტები არ შეიძლება კლასიფიცირებული იყვნენ როგორც თერმომედეგები, მსჯელობა შეიძლება მხოლოდ მათ ფიზიოლოგიურ მედეგობაზე. დღეისათვის თერმომედეგობის შეფასების რამოდენიმე კრიტერიუმი არსებობს: ფიზიოლოგიური, ენზიმოლოგიური (შედარებითი ხასიათის), სამრეწველო და სხვა. ჩვენი ღრმა რწმენით, ნამდვილ თერმომედეგ ფერმენტებს მიეკუთვნებიან ისეთები, რომლებისთვისაც 60-65° ტემპერატურის პირობებში, სუბსტრატის გარეშე, ნახევრად ინაქტივაციის დრო შეადგენდეს არა ნაკლებ 20-30 წთ-ს, ხოლო მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმი არა ნაკლებ 60°-ს 1 სთ-ის განმავლობაში.

მედეგი ფერმენტების სხვადასხვა ფორმებს შორის ყველაზე ფართო გამოყენება უკვე პოვეს თერმომედეგმა ფერმენტებმა. პირველ რიგში ეს იმით აიხსნება, რომ მაღალი ტემპერატურების (60°და მეტი) დროს მინიმუმამდე დადის შესაძლო მიკრობული დაბინძურება, მცირდება ხსნარების სიბლანტე, იზრდება საბოლოო პროდუქტის გამოსავალი და სისუფთავე, რაც აიხსნება თანაური რეაქციების შემცირებით. თუ მხედველობაში მივიღებთ იმასაც, რომ სამრეწველო პირობებში, ზოგიერთ შემთხვევაში, ფერმენტული რეაქციები მიმდინარეობენ დღე-ღამეების

ეროვნული ბიბლიოთეკა

განმავლობაში, საჭიროა შემოვიტანოთ ოპერაციული ტემპერატურული ოპტიმუმის მცნება, რადგან გათვალისწინებული იქნეს ფერმენტების ხანგრძლივი გამოყენება განსაზღვრული ტემპერატურის პირობებში. ეს იმით აიხსნება, რომ 3-5 წთ-ის განმავლობაში მაღალი ტემპერატურა, არენიუსის განტოლების თანახმად, ზრდის რეაქციის სიჩქარეს ფერმენტის ინაქტივაციის გარეშე. უფრო ხანგრძლივი ინკუბაციის შედეგად ხდება ფერმენტის ინაქტივაცია ტემპერატურის ზემოქმედებით. ცხადია რომ, უმეტეს შემთხვევაში ოპერაციული ტემპერატურული ოპტიმუმი უნდა იყოს 5°-ით მაინც ნაკლები, ფერმენტების მოქმედების ოპტიმუმთან შედარებით, რომელიც განსაზღვრულია რეაქციის მაქსიმალური სიჩქარის (Vmax) დადგენისათვის 3-5 წთ-ის განმავლობაში.

დღეისათვის, სამრეწველო პირობებში ფერმენტული რეაქციების უმრავლესობა მიმდინარეობენ 50°-ზე და უფრო დაბალ ტემპერატურებზე.

მრეწველობაში ფერმენტების გამოყენება ძირითადად ხდება კვების, ფარმაცევტულ და მსუბუქ მრეწველობაში. ფერმენტული პრეპარატების ინტენსიურ გამოყენებაზე მეტყველებს ის ფაქტიც, რომ 1984 წ-ში აშშ-ში გაყიდული იქნა 400 მილიონი დოლარის ფერმენტული პრეპარატები და ეს ციფრი იზრდება ყოველწლიურად 10-15%-ით. მე-3 ცხრილში მოყვანილია ის შედარებით თერმომედეგი ფერმენტები რომლებიც უკვე გამოიყენება პრაქტიკაში (შედგენილია ავტორის მიერ).

როგორც მე-3 ცხრილის მონაცემებიდან სჩანს ფერმენტული რეაქციების უმეტესობა 50-60° პირობებში მიმდინარეობს. ცხადია, რომ ამ დარგებში თერმომედეგი ფერმენტების გამოყენებას დიდი პერსპექტივა გააჩნია. მედიცინაში თერმომედეგ ფერმენტებს უპირატესობა არ ენიჭებათ, იქ უფრო საინტერესოა პროტეოლიზის მიმართ მდგრადობა, ბიოლოგიური შეთავსება და სხვა.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ცხრილი №3

მრეწველობაში გამოყენებული თერმომედეგი ფერმენტები

ფერმენტი	გამოყენების სფერო	ოპერატ. ტემპ. ოპტიმუმი (°C)	სასურველი ტემპ.ოპტ.(°C)
1	2	3	4
კარბოჰიდრაზები:			
α-ამილაზა (ბაქტერიული)	სახამებლის ჰიდროლიზი ლუდის წარმ.,დეტერგენტი, (სარეცხი საშუალ.)	90	90
α-ამილაზა (სოკოური)	სახამებლის ჰიდროლიზი სპირტის წარმოება, პურის ცხობა	50	70 (გარდა პურის ცხობისა)
გლუკოამილაზა	სპირტის წარმოება, მალტოდექსტრინების ჰიდროლიზი	50	70 და მეტი
პულულანაზა	გლუკოზის ვაჟინის მიღება	50	70 და მეტი
ქსილოზოიზომერაზა	ფრუქტოზის ვაჟინის მიღება	50	70 და მეტი
პექტინაზა	წვენების წარმოება	20-50	50-60
ცელულაზა	ცელულოზის ჰიდროლიზი	50	65 და მეტი
პროტეაზები:			
მჟავე პროტეაზა	წვენების წარმოება პურის ცხობა	30-50	50-60
სოკოური პროტეაზები(ნეიტრალური	კვების მრეწველობა: პურის ცხობა, ლუდის წარმოება	50-55	50-55
ტუტე პროტეაზები	დეტერგენტი	50	70 და მეტი
ლიპაზები		40-60	70 და მეტი

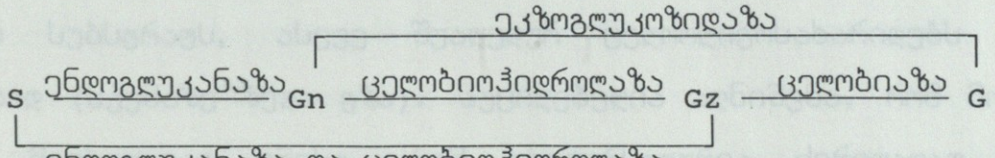
ეროვნული ბიბლიოთეკა

უნდა აღინიშნოს, რომ №3 ცხრილში მოყვანილი ფერმენტები მთლიანად მიკროორგანიზმებიდან არიან მიღებული და საერთოდ მრეწველობაში გამოყენებული ფერმენტების 95%-ზე მეტი მიკრობული წარმოშობისაა. ქვემოთ ავტორის დაკვირვებიდან გამომდინარე თანმიმდევრობით მითითებულია მიკროორგანიზმების ტაქსონომიური ჯგუფები მათ მიერ წარმოქმნილი ფერმენტების თერმომედეგობის მიხედვით: თერმოფილური ბაქტერიები-> ბაქტერიები-> თერმოფილური მიკროსკოპული სოკოები-> მიკროსკოპული სოკოები-> საფუარები-> აქტინომიცეტები.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

1.2. თერმოფიდური მიკროორგანიზმების ცელულაზები

ფერმენტული სისტემა რომელიც ახდენს ცელულოზისა და მისი წარმოებულების ჰიდროლიზურ დაშლას ცნობილია ცელულაზური კომპლექსის სახელწოდებით. თანამედროვე შეხედულებით (40-41) ცელულაზური კომპლექსი შედგება ოთხი ტიპის კარბოჰიდრაზებისაგან: ენდო-1,4-β-გლუკანაზა (1,4-β-გლუკან-4-გლუკანოჰიდროგენაზა; КФ 3.2.1.4), ეკზო-1,4-β-გლუკონაზა (ეკზოცელობიოჰიდროლაზა ანუ 1,4-β-გლუკან-ცელობიოჰიდროლაზა; КФ 3.2.1.91), ეკზო-1,4-β-გლუკოზიდაზა (1,4-β-გლუკოჰიდროლაზა; КФ 3.2.1.74) და ცელობიაზა (β-გლუკოზიდაზა ანუ -β-გლუკოზიდ-გლუკოჰიდროლაზა; КФ 3.2.1.21). ცელულოზის ფერმენტული ჰიდროლიზის ზოგადი სქემა შეიძლება წარმოდგენილი იქნეს შემდეგნაირად (სქემა 1):



სადაც: S -საწყისი სუბსტრატი;

Gn -ცელოოლიგოსახარიდები;

Gz -ცელობიოზა;

G -გლუკოზა.

მოცემული სქემა არის პრინციპული და შეიძლება ჩაითვალოს უნივერსალურად, რამდენადაც იგი გამოსახავს ცელულოზის ჰიდროლიზური დეგრადაციის ყველა შესაძლო გზას. ენდოგლუკანაზა მოქმედებს საწყის უხსნად სუბ-

ეროვნული ბიბლიოთეკა

სტრატზე (42,43), რის შედეგადაც წარმოიქმენება პოლიმერიზაციის სხვა-დასხვა ხარისხის მქონე ოლიგოსახარიდები (44), ცელობიოზა (45-52) და მცირეოდენი გლუკოზა (47). უხსნადი ცელულოზისაგან ოლიგოსახარიდების წარმოქმნას შეიძლება ჰქონდეს ქაოსური ხასიათი; ამ რეაქციის დეტალური კინეტიკური მექანიზმი ნაკლებადაა შესწავლილი, განსაკუთრეკბით სხვადასხვა ზემოლეკულური სტრუქტურის მქონე სუბსტრატებისათვის. მეორეს მხრივ, შუალედური ცელობიოზა, როგორც 1 სქემაზეა ნაჩვენები შეიძლება წარმოიქმნას ორი სხვადასხვა გზით - საწყის ცელულოზაზე ენდოგლუკანა-ზების და შემდგომ წარმოქმნილ ცელოოლიგოსახარიდებზე ცელობიოჰიდროლა-ზების მოქმედებით (სქემაზე პირდაპირი გზა), და ენდოგლუკანაზების უშუალო მოქმედებით საწყის სუბსტრატზე (სქემაზე ქვედა გზა). ცელობიოზაზე ცელულაზური კომპლექსის კიდევ ერთი ფერმენტის - ცელობიაზის მოქმედებით მიიღება რეაქციის საბოლოო პროდუქტი გლუკოზა (G). ამ ჯგუფის მეოთხე ფერმენტი - ეკზოგლუკოზიდაზა შლის როგორც საწყის სუბსტრატს, ასევე შუალედურ ცელოოლიგოსახარიდებს უშუალოდ გლუკოზად (სქემაზე ზედა გზა). აუცილებელია აღნიშვნა, რომ მოყვანილი სქემა მიუხედავად იმისა, რომ უნივერსალურია ძირითადად ასახავს მეზოფილური სოკოების ცელულაზებს.

არსებობს სხვა მოსაზრებებიც ცელულოზის ფერმენტულ ჰიდროლიზზე (53,54), რომლებიც შეესაბამება ზემოთ მოყვანილ სქემას, მაგრამ რამდენადმედ განსხვავდება მისგან.

სულ სხვა სურათია თერმოფილურ მიკროორგანმზმებში, რომლებიც ასევე წარმოადგენენ ცელულაზების პროდუცენტებს. როგორც ცნობილია, ცელულოზის ჰიდროლიზის უნარი, თერმოფილ მიკროორგანიზმებს შორის, გააჩნია ბაქტერიების: აეროობულ (15,49), ანაერობულ (55,50,56) და მიცელიალურ სოკოებს.

ცელულაზებს შორის, რომლებსაც წარმოქმნიან თერმოფილური ბაქტერიები

ეროვნული ბიბლიოთეკა

აღმოჩენილია სოკოების ენდოგლუკანაზების ანალოგი ფერმენტები. მიუხედავად იმისა, რომ ბაქტერიული ენდოგლუკანაზები თერმომედეგობით აღემატებიან სოკოეურს (51,52), მათ არ გააჩნიათ უნარი აწარმოონ ცელულოზის ჰიდროლიზი გლუკოზამდე, რამეთუ დაბალმოლეკულური ცელოოლიგოსაქარიდების დამშლელი ფერმენტები არ გააჩნიათ. აქედან გამომდინარე ბაქტერიები ჯერ კიდევ არ განიხილებიან როგორც მრეწველობისათვის მნიშვნელოვანი ფერმენტების წყარო. სხვა სურათია თერმოფილურ სოკოებთან მიმართებით, მიკროორგანიზმების ეს ჯგუფი წარმოადგენს ევოლუციურად და ეკოლოგიურად განცალკევებულ ნიშას, რომელიც ითვლის 32-მდე სახეობას (56), და ცნობილია როგორც განსაკუთრებულად მდიდარი გენეტიკური სპექტრის მქონე ორგანიზმები.

თერმოფილური სოკოების შესწავლის შედეგად შესაძლო გახდა ცალკეული გვარების ცელულაზური აქტივობის მიხედვით დახასიათება. ესენია: **Chaetomium, Sporotrichum, Thielavia, Mucor, Malbraunchea,** რამდენადმე ნაკლებადაა გამოხატული თერმოფილური თვისებები კულტურა **Aspergillus**-ის წარმომადგენლებში (57,58).

ცელულაზების პროდუცენტების, თერმოფილური სოკოების სისტემატური კვლევის შედეგებმა შესაძლებელი გახადა დადგენილიყო მათი სიღრმული და ზედაპირული კულტივირების პირობები მიკროკრისტალურ ცელულოზაზე (59,60), როგორც ნახშირბადის ერთადერთ წყაროზე. ცელულაზების პროდუცენტებს, როგორც მეზოფილებს, ასევე თერმოფილებს, ცელულაზების ინტენსიური სინთეზის უნარი გააჩნიათ მხოლოდ ცელულოზაზე და მის წარმოებულებზე ზრდისას. ამდენად სამრეწველო პირობებში დიდი მნიშვნელობა ენიჭება ცელულოზის რომელიმე სახის ნახშირბადის წყაროს შერჩევას, რომელიც ამავე დროს ცელულაზების ინდუქტორის როლსაც შეასრულებს. მიღებულია მთელი რიგი, ცელულაზების პროდუცენტი აქტიური მუტანტური შტამები და შესწავლილია მათ მიერ წარმოქმნილი ეგზოგენური

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ცელულაზები სიღრმული კულტივირების პირობები (61,63).

600°-ზე მეტი თერმოფილური მიცელიალური სოკოების კულტურის შესწავლამ დაგვანახა, რომ თერმოფილური მიკრომიცეტების ცელულაზები, როგორც წესი შეიცავენ ენდოგლუკანაზასა და β-გლუკოზიდაზას (63). თერმოფილური სოკოების კულტურებში ცელობიოჰიდროლაზებისა და ეკზოგლუკოზიდაზების არსებობა ერთმნიშვნელოვნად არ არის დადგენილი (57,58). ავტორების მიერ წარმოდგენილია თერმოფილური მიცელალური სოკოებიდან გამოყოფილი ცელულაზების მიერ ცელულოზის ჰიდროლიზის მექანიზმი (მე-2 სქემა):

1. ცელულოზა + ენდოგლუკანაზა -> ჰიდროლიზის მაღალმოლეკულური პროდუქტები. (სწრაფი რეაქცია)
2. მაღალმოლეკულური შაქრები + ენდოგლუკანაზა -> დაბალმოლეკულური ცელოოლიგოსახარიდები (დი, ტრი, ტეტრასახარიდები - ნელი რეაქცია);
3. დაბალმოლეკულური შაქრები + ცელობიაზა -> გლუკოზა.

როგორც ავტორები აღნიშნავენ, თერმოფილური მიკრომიცეტებიდან მიღებულ ცელულაზებს რეაქციის პროდუქტებით ინჰიბირების უმნიშვნელო ხარისხი ახასიათებთ და ისინი საკმაოდ ეფექტურად აწარმოებენ ცელულოზის ჰიდროლიზს გლუკოზამდე. ცელობიოჰიდროლაზების გარეშე, ცელულოზის ჰიდროლიზის პროცესის მაღიმიტირებელ ფაქტორად, ამ მექანიზმის თანახმად, უნდა ჩაითვალოს დაბალი მოლეკულური ცელოოლიგოსაქარიდებიდან გლუკოზის წარმოქმნა. მეზოფილური (1 სქემა) და თერმოფილური (2 სქემა) სოკოების ფერმენტული პრეპარატებით ცელულოზის ჰიდროლიზის შედარებით, ძნელი არ არის დარწმუნება იმაში, რომ თერმოფილებში ცელობიოჰიდროლაზების დეფიციტი არსებითად ცვლის ჰიდროლიზის მექანიზმს, რითაც მნიშვნელოვნად იზრდება ამ პროცესში ენდოგლუკანაზის როლი. ექსპერიმენტულად დამტკიცებული იქნა რომ, თერმოფილური მიკრომცეტების

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ჰომოგენური ენდოგლუკანაზები აწარმოებენ როგორც ამორფულ, ისე კრისტალური ცელულოზის ღრმა ჰიდროლიზს, რის შედეგადაც წარმოიქმნება შემდეგი პროდუქტები: გლუკოზა, ცელობიოზა, ცელოტრიოზა და ცელოტეტრაოზა (64-66). ყოველივე ეს კი მიუთითებს მე-2 სქემის სამართლიანობაზე და კიდევ ერთხელ ამტკიცებს თერმოფილური სოკოების ენდოგლუკანაზების ფართო სუბსტრატულ სპეციფიურობას.

დღეისათვის ლიტერატურაში დიდი რაოდენობით გვხვდება მონაცემები მეზოფილების ენდოგლუკანაზებზე. ამ მიმოხილვაში შეუძლებელია ამ მონაცემების მცირეოდენი ნაწილის განხილვაც კი, ამიტომ შემოვიფარგლებით კულტურა T.reesei-ით (სხვანაირად მას უწოდებენ T.viride) და მისი მუტანტებით, აღნიშნული კულტურები წარმოქმნიან აქტიურ უჯრედგარე ენდოგლუკანაზებს, და უჯრედგარეშე ცელულაზების თვალსაზრისით კლასიკურ მაგალითს წარმოადგენენ (მე-4 ცხრილი).

ცხრილში მოყვანილ ენდოგლუკანაზების მოლეკულურ თვისებებში ყურადღებას იქცევს დიდი სხვაობა მოლეკულურ მასებში (42500-55000) და ნახშირწყლების შემცველობაში. სავარაუდოა, რომ ამ შემთხვევაში საქმე გვაქვს ფერმენტის სხვადასხვა იზო- და მოლეკულურ ფორმებთან, მაგრამ ისიც უნდა გავითვალისწინოთ, რომ ესეთი სხვაობა შესაძლებელია კულტურის მუტაგენებით დამუშავებამ გამოიწვია.

როგორც მე-4 ცხრილიდან ჩანს T.viride-ს ენდოგლუკანაზის გაწმენდის ძირითად მეთოდს წარმოადგენს იონცვლადი ქრომატოგრაფია, გელფილტრაცია და აფინური ქრომატოგრაფია. ამ მიზნებისათვის გამოყენებული იქნა სეფადექსები, ცნობილი ბიოსორბენტები და იონცვლადი მატარებლები. ენდოგლუკანაზების გაწმენდისას ძალზედ მაღალი ეფექტურობით ხასიათდებოდა აფინური ქრომატოგრაფია (67-69). მე-4 ცხრილის მონაცემებით ენდოგლუკანაზების მოლეკულური მასა მერყეობდა 12 500-დან 55 000-მდე. არ არის გამორიცხული, რომ ენდოგლუკანაზები მოლეკულური

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ცხრილი №4

T. viride-ს მუტანტების ენდოგლუკანაზების თვისებები

პროდუცენტი	გაწმენდის პრინციპი	M.(მოლ. მასა)	pI(იზო-წერტილი	ნახშირწყ შემცველ.	სუბსტრატ. სპეციფ.	ლიტ
1.T.viride	გელ ფილტრაც.	50 000	3,39	12	ფ.ქ.კმც	67
ცელულაზა	იონცვლადი,	12 500	4,6	21	ფ.ქ.კმც	
ონოზუკა	აფინური ქრ.					
2.T.viride	აფინური,		-		კმც	
Pancellase SS	იონცვლადი	52 000	-	15,0	კმც	68
	ქრომატ.	49 000	-	15,2	ავიცელი	
3.T.viride	იონცვლადი,					
QM 9414	გელ ქრომატ.	20 300	7,5	0	კმც	71
4.T.reesei	გელ და იონ-	52 000	-	-	კმც	70
QM 9414	ცვლადი ქრ.	18 000	-	-	კმც	
5.T.viride	აფინური	51 000	4,66	0	კმც	69
QM 9414	ქრომატ.					
6.T.reesei	იონცვლადი	54 000	4,7	-	კმც	72
L 27	ქრომატ.					
7.T.reesei	იონცვლადი	55 000	4,5	10	კმც	97
QM 9414	ქრომატ.	48 000	5,5	6,0	ავიცელი	98
8.T.reesei	გელ და იონ-	50 000	-	-	კმც,ავიცე	99
celleslast	ცვლადი ქრ.	48 000	-	-	კმც	
9.T.reesei	იონცვლადი	48 000	-	15	კმც	100
VTT-D-80133	ქრომატ.					

ეროვნული ბიბლიოთეკა

მასებით 12 500 და 18 000 (67,70) წარმოადგენენ ცელულოზის ფრაგმენტებს. იზოელექტრული წერტილი, გარდა ფერმენტის ერთი ფორმისა, რომელიც ტოლია 7,5 (71,72), მდებარეობს მჟავე არეში. რაც შეეხება ნახშირწყლებს ყველა ფორმა გარდა ორისა (69,71), შეიცავს 4-დან 15%-მდე ნახშირწყლოვან ნაშთს. მე-4 ცხრილში მოყვანილი ყველა ენდოგლუკანაზა ახდენდა კმც-ს ჰიდროლიზს, ზოგიერთი მათ შორის შლის მიკროკრისტალურ ცელულოზასაც.

T. viride-დან მიღებული მუტანტები, როგორც წესი შეიცავენ ენდოგლუკანაზის ორ, სამ და მეტ მოლეკულური ფორმებს. T. reesei-ის უჯრედგარე ცელულაზები სრულადაა დახასიათებული ლაპალაინენის (73) ნაშრომში, სადაც წარმოდგენილია ვრცელი მასალა ცელობიოჰიდროლაზებსა (74-81) და β-გლუკოზიდაზებზე (81-86).

თერმოფილური მიკროორგანიზმების, სოკოების ენდოგლუკანაზების შესახებ ინფორმაცია ლიტერატურაში შედარებით მცირე რიცხოვანია. მაგრამ უნდა ითქვას, რომ მათი უმრავლესობა თერმომედეგობით აღემატება მეზოფილური მიკროორგანიზმების ანალოგებს. თერმომედეგი ცელულაზების პრაქტიკაში გამოყენებას, უკანასკნელ წლებში, მიეძღვნა ბევრი ნაშრომი, რომლებშიც განხილულია როგორც ფერმენტების ასევე პროდუცენტების გამოყენების პერსპექტივები.

აქ პირველი ნაბიჯი გადაიდგა როცა გამოვლენილი იქნა თერმოფილური ბაქტერია, რომელიც წარმოადგენდა ცელულაზების პროდუცენტს. ავტორები (87) განსაკუთრებით დაინტერესებული იყვნენ ისეთი ფერმენტის აღმოჩენით, რომელსაც ექნებოდა მაღალი თერმომედეგობა. შემდგომში სკრინინგი ჩატარდა ფერმენტების კრისტალური ცელულოზის დეგრადაციის უნარის მიხედვით. ამ კვლევების საბოლოო მიზანი იყო ისეთი ბაქტერიის გამოვლენა, რომელიც დაშლიდა ნატურალურ ცელულოზურ მასალას მისი წინასწარი მინიმალური დამუშავების შემდეგ. აღმოჩნდა, რომ ორი

ეროვნული

არაიდენტიფიცირებული კულტურა TP8 და TP10 ითვისებდნენ კრისტალურ ცელულოზას კულტურალური სითხიდან, ხოლო კულტურის სუპერნატანტის აქტივობის განსაზღვრამ დაამტკიცა, რომ მათ ახასიათებთ კრისტალური ცელულოზის სრული ჰიდროლიზის უნარი აღმდგენელ შაქრებამდე. ორივე კულტურის ცელულაზების სპეციფიური აქტივობები შედარებული იქნა Clostridium thermocellum-ის ცელულაზის აქტივობასთან. მიუხედავად იმისა, რომ C. thermocellum იზრდებოდა 60°C, ხოლო საკვლევი ბაქტერიები - 70°-ზე, ავტორებმა ორივე პრეპარატი ჩათვალეს ძალზე მაღალი თერმომედეგობის მაგალითებად.

და ბოლოს შეადარებული იქნა C. thermocellum-ისა და საკვლევი ბაქტერიების ენდოგლუკანაზების თერმომედეგობა. რის შედეგადაც დადგინდა, რომ 85° ტემპერატურაზე TP8-ს ენდოგლუკანაზა ინარჩუნებდა საწყისი აქტივობის ნახევარს 5 სთ-ის განმავლობაში, იმავე პირობებში TP10-ის ენდოგლუკანაზა აქტიობის 50%-ს 20 წთ-ში კარგავდა, ხოლო C. thermocellum-ის ენდოგლუკანაზა კი 5 წთ-ში.

როგორც ცნობილი გახდა ცელულაზურ ფერმენტებს გამოყოფს არაიდენტიფიცირებული დაუდგენელი ანაერობული თერმოფილური ბაქტერია BW (88). ავტორების მიერ გამოყოფილი და შედარებული იქნა შტამი BW-ს ენდოგლუკანაზა, Clostridium thermocellum-ის ენდოგლუკანაზასთან. ნაშრომში აღწერილია ენდოგლუკანაზისა და ქსილანაზის დაყოფა, მოცემულია შტამმ BW-ს ენდოგლუკანაზის გაწმენდის მეთოდი და მისი თვისებები. შტამი BW კულტივირება ხდებოდა ანაერობულ პირობებში 60°C ტემპერატურაზე. ფერმენტის აქტივობის დაკარგვა არ შეინიშნებოდა 4 დღის ინკუბაციის შემდეგაც კი. ავტორები აკეთებენ დასკვნას იმის შესახებ, რომ თერმოფილურ ანაერობულ ცელულაზებს აქვთ მოქმედების ძალზე მაღალი ტემპერატურული ოპტიმუმი. შტამმ BW-ს ენდოგლუკანაზამ გამოავლინა უფრო მაღალი თერმომედეგობა, ვიდრე C. thermocellum-ისა და ნებისმიერი

ეროვნული ბიბლიოთეკა

თერმოფილური სოკოების ენდოგლუკანაზამ. ამასთან ერთად დადგენილი იქნა, რომ ცელობიოზის გარკვეული კონცენტრაციები იწვევენ მნიშვნელოვანი ხარისხით BW-ს ენდოგლუკანაზის ინჰიბირებას, მაშინ როცა ეს კონცენტრაციები არსებით გავლენას არ ახდენენ C. thermocellum-ის ენდოგლუკანაზაზე. სამწუხაროდ, არაფერია ცნობილი ამ ფერმენტის მიერ მიკროკრისტალური ცელულოზის ჰიდროლიზის შესახებ.

არსებული მონაცემებით, ცელულოზის დამშლელი სოკოების ცელულაზების მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმი ძირითადად შეესაბამება პროდუცენტების კულტივირების ტემპერატურას. ფერმენტების კომპონენტური შედგენილობა შესამჩნევად მერყეობს იმასთან დაკავშირებით, თუ რა გვარისა და სახეობისაა პროდუცენტი (63).

თერმოფილური სოკოების ენდოგლუკანაზები თერმომედეგობის მიხედვით ჩამოუვარდებიან ექსტრემალური თერმოფილური ბაქტერიების ანალოგებს. მეორეს მხრივ, მიცელიალური სოკოების მიერ სინთეზირებული ცელულაზები თავიანთი ტექნოლოგიური თვისებების გამო (კარგი ადსორბციული თვისება, სუბსტრატის ღრმა ჰიდროლიზი, ცელულოზის დეგრადაციაში მონაწილე ფერმენტების სრული ანაკრეფი) მნიშვნელოვნად სჯარბობენ ნებისმიერი სხვა მიკროორგანიზმების ცელულაზებს. თერმოფილი-სოკოების ცელულაზებს უნარი აქვთ ხანგრძლივი ჰიდროლიზი აწარმოონ 65°-ზე (პასტერიზაციის ტემპერატურა), რომლის დროსაც უზრუნველყოფილია ჰიდროლიზის პროდუქტების სტერილობა. ბოლო 5-7 წლის განმავლობაში გაიზარდა იმ ნაშრომების რაოდენობა, რომლებიც მიეძღვნა თერმოფილების ცელულაზებს. გამოკვლეულია მეზოფილების: T. reesei, Penicillum sp. და თერმოფილების: Thielavia terrestris, Sp. cellulophilum (89) ცელულაზების პრეპარატები. აღნიშნული კვლევა ჩატარდა საინტერესო მეთოდოლოგიით. საკვლევ ფერმენტულ ხსნარებს ათავსებდნენ ციტრატულ ბუფერში pH 4.8 60° პირობებში და დროის სხვადასხვა შუალედებში 48 სთ-მდე საზღვრავდნენ

ეროვნული ბიბლიოთეკა

აქტივობას. ნახევრად ინაქტივაციის სიდიდის მიხედვით დადგენილი იქნა, რომ T.terrestris პრეპარატი ხასიათდება უფრო მაღალი ნარჩენი აქტივობით ყველა ცელულაზური კომპონენტის მიმართ.

განხილული იქნა თერმოფილური სოკოს Talaromyces emersonii-ის მიერ წარმოქმნილი ცელულაზების თვისობრივი მახასიათებლები (90,91). ცელულოზის შემცველ არეზე ზრდისას, კულტურა წარმოქმნის უკრედგარე ცელულაზურ კომპლექსს, რომელიც შესდგება ოთხი ენდოცელულაზისაგან, ოთხი ეკზოცელულაზისაგან და სამი β-გლუკოზიდაზისაგან. თითოეული ამ ენდოცელულაზებიდან მაქსიმალურ აქტივობას ავლენდა pH 5.5-5.8 და 60°C-ის პირობებში. აქტივობა მკვეთრად ეცემოდა მჟავე არეში pH 3.5-ის ქვევით. pH 5-ის პირობებში კმც-ს ჰიდროლიზისათვის ოპტიმალური ტემპერატურა შეადგენდა 75°-ს.

თერმოფილური სოკო Alternaria alternata-ს კულტურიდან Macris-ის მიერ (1984,92) გამოყოფილი და დახასიათებული იქნა ენდო-1,4-β-გლუკანაზები და β-გლუკოზიდაზა. დადგენილი იქნა მიხაელის-მენტენის მუდმივები: ენდოგლუკანაზისათვის კმც-ს მიმართ, რომელიც ტოლია 16,6 გ/ლ და β-გლუკოზიდაზისათვის ცელობიოზისა და პარანიტროფენილგლუკოზიდის მიმართ, რომელიც შესაბამისად ტოლია-1,14 და 0,81 mM. ენდოგლუკანაზა შედარებით აქტიურია 50-60° ტემპერატურისა და pH 5-6-ის ფარგლებში. დიდ ინტერეს იწვევს β-გლუკოზიდაზა, რომელიც უფრო აქტიურია pH 4-5 და 70-75° ტემპერატურის ფარგლებში. გაუწმენდავი ფერმენტის ნახევრადინაქტივაციის დრო 60, 65 და 70° ტემპერატურებზე შეადგენდა შესაბამისად 74 სთ, 48 სთ და 10 წთ, მაშინ როცა ჰომოგენური ფერმენტის შემთხვევაში ტოლი იყო 19,2 სთ, 1,1 სთ და 7,8 წთ. უნდა აღინიშნოს, რომ ეს არის იშვიათი შემთხვევა, როგორც თერმოფილებისათვის ასევე მეზოფილებისათვის, როდესაც მათ მიერ წარმოქმნილი β-გლუკოზიდაზა ენდოგლუკანაზაზე უფრო მედეგია.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

თერმოფილური სოკო **Humicola insolens** (93) წარმოქმნის ფერმენტების სისტემას, რომელიც ახდენს ავიცელის, კმც-ს და გაზეთის ქაღალდის ჰიდროლიზს გლუკოზამდე. ფერმენტული პრეპარატიდან აფინური ქრომატოგრაფიის საშუალებით გამოყოფილია ენდოგლუკანაზა და ცელობიოჰიდროლაზა. აღნიშნული ენდოგლუკანაზა თერმომედეგია და ინარჩუნებს საწყისი აქტივობის 45%-ს 95° ტემპერატურაზე 5 წთ-ის განმევლობაში, ცელობიოჰიდროლაზა ნაკლებად მედეგია და ინარჩუნებდს მხოლოდ 20% აქტივობას 70°c ინკუბაციისას 5 წთ-ის განმავლობაში.

თერმომედეგი ცელულაზების პროდუცენტი კიდევ ერთი თერმოფილური სოკო **Miceliophtora termophile** (94) წარმოქმნის უკრედგარე ფერმენტების სისტემას, რომელსაც უნარი აქვს აწარმოოს ბამბის ბოჭკოს ჰიდროლიზი აღმდგენელ შაქრებამდე. ამ სოკოს მიერ წარმოქმნილი ფერმენტები მაღალ აქტივობებს ავლენდნენ ფილტრის ქაღალდის და კმც-ს მიმართ 70°c-ზე, ბამბის მიმართ 60° ტემპერატურაზე. თერმოფილური სოკო **Term. aurantiacus**-დან (95) გამოყოფილი იქნა ოთხი უკრედგარე ცელულოლიტიკური ფერმენტი: β-გლუკოზიდაზა, ენდოგლუკანაზა (I), ენდოგლუკანაზა (II), ეკზოგლუკოზიდაზა, რომლებიც შეიცავდნენ შესაბამისად 33%, 5,5%, 1,8% და 2,6% ნახშირწყლებს. ბოლო სამი ფერმენტი აქტიურია ფილტრის ქაღალდის მიმართ, ხოლო ენდოგლუკანაზა (I) და ენდოგლუკანაზა (II) აწარმოებენ კმც-ს სწრაფ ჰიდროლიზს. β-გლუკოზიდაზა, ენდოგლუკანაზა I, II და ეკზოგლუკოზიდაზა 70° ტემპერატურაზე 1 სთ-ის განმავლობაში ინარჩუნებდნენ შესაბამისად 70, 70, 40, 70% აქტივობებს.

ეგზოგენური თერმომედეგი ცელულაზების მიღების მიზნით თერმოფილური კულტურა **Thielavia terrestris**-ს (96) ზრდიდნენ ფერმენტიორში (114ლ) 1%-იან სულფიტურ არეში 52° ტემპერატურაზე. კმც-აზური აქტივობის ნახევრადინაქტივაციის დრო 60°-ზე შეადგენდა 5სთ-ს, ქსილანაზური -7სთ-ს, ხოლო ფილტრის ქაღალდის-4სთ-ს. 70° ტემპერატურაზე

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ინკუბირებისას 50%-იანი კმც-აზური აქტივობა შენარჩუნებული იყო 2სთ-ის განმავლობაში, ხოლო გლუკოზიდაზური-6სთ-ის. ყველაზე უფრო თერმომედეგი აღმოჩნდა β-გლუკოზიდაზური აქტივობა, რომელიც 40სთ-ის განმავლობაში 60° ტემპერატურაზე კარგავდა აქტივობის მხოლოდ 25%-ს. 2%-იანი NaOH-ით 30წთ-ის განმავლობაში, 50° ტემპერატურაზე, 6,8%-იანი ხორბლის ნამჯის სუსპენზიის ჰიდროლიზის დროს კულტურის ფილტრატით მიღებული აღდგენილი შაქრები შეადგენდნენ სუბსრტატის მასის 24%-ს.

სელექციის შედეგად შერჩეული იქნა კულტურა Chaetomium thermophile - თერმომედეგი ცელულაზების პროდუცენტი (64). დადგინდა, რომ ამ კულტურის ენდოგლუკანაზები თერმომედეგობის მიხედვით აღემატებიან ბევრ თერმოფილური მიკრომიცეტების ენდოგლუკანაზებს. გამოყოფილი იქნა ცელულაზების ფერმენტული პრეპარატი ორგანული გამხსნელებით. დადგინდა ფერმენტის მოქმედებისათვის ოპტიმალური პირობები: pH 4,5-4,8, ტემპერატურა-60°. ნაჩვენები იქნა ენდოგლუკანაზების მაღალი ადსორბციის უნარი ცელულოზაზე და ცელობიოზით ინჰიბირების არაკონკურენტული ხასიათი. შემუშავებულა ენდო β-1,4-β-გლუკანაზის გაწმენდის მეთოდი, რომელიც მოიცავდა ფრაქციონირებას აფინურ სორბენტ-მიკროკრისტალურ ცელულოზაზე, იონცვლადი ქრომატოგრაფიას DEAE-650 Toyopearl-ზე, გელფილტრაციას-HW 55 Toyopearl-ზე. გაწმენდის ხარისხი ტოლი იყო 46-ის. დადგენილი პრეპარატის უნარი აწარმოოს ამორფული და კრისტალური ცელულოზის ჰიდროლიზი გლუკოზამდე, ცელობიოზამდე, ცელოტრიოზამდე და ცელოტეტრაოზამდე. ნაჩვენება, რომ ცელობიოზა იწვევს Chaetomium thermophile-ს თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის უმნიშვნელო ინჰიბირებას. გაწმენდილი ენდოგლუკანაზა არ კარგავს მისთვის დამახასიათებელ თერმომედეგ თვისებას. გამოთქმული იქნა მოსაზრებები იმ მიზეზების შესახებ, რომლებიც განაპირობებენ ფერმენტის თერმომედეგობას: ჰიდროფობული და α-სპირალწარმომქმნელი ამინომჟავების გაზრდილი

ეროვნული ბიბლიოთეკა

რაოდენობა, კოვალენტურად დაკავშირებული ნახშირწყლების - დიდი ფრაგმენტების არსებობა. განსაკუთრებით უნდა აღინიშნოს, რომ არც ერთი თერმომედეგი ენდოგლუკანაზა არ შეიცავს ცისტეინს.

მაშასადამე, როგორც თერმოფილური მიკრომიცეტების ენდოგლუკანაზების ანალიზი გვიჩვენებს, მათი უმრავლესობა ხასიათდება მაღალი თერმომედეგობით მეზოფილური სოკოების ენდოგლუკანაზებთან შედარებით, მაგრამ ჩამორჩება ამ მახასიათებლებით ბაქტერიების ენდოგლუკანაზებს. თერმოფილი - სოკოების ენდოგლუკანაზების მოლეკულური მახასიათებლები არ არის საკმარისი იმისათვის, რომ გავაკეთოთ რაიმე დასკვნები მათი განსაკუთრებული აღნაგობის შესახებ. მიღებული მონაცემები მიუთითებენ თერმოფილების და მეზოფილების ენდოგლუკანაზების ფიზიკო - ქიმიური მახასიათებლების მსგავსებაზე.

ცხრილი №5-ში წარმოდგენილია თერმოფილური და მეზოფილური სოკოებიდან გამოყოფილი ენდოგლუკანაზების შედარებითი თერმომედეგობა.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ცხრილი №5

თერმოფილური და მეზოფილური სოკოებიდან გამოყოფილი ენდოგლუკანაზების თერმომედეგობა

კულტურა	ინკუბაციის ტემპერატურა	ნახევრადინაქტივაციის დრო	ლიტერატურული წყარო
1	2	3	4
1.Aspergillus fumigatus	75	60 (წთ)	(146)
2.Trichoderma viride	45	133 (სთ)	(102)
3.Aspergillus niger	45	91 (სთ)	(102)
4.Trichoderma harzianum	50	25 (სთ)	(103)
5.Trichoderma reesei	60	4 (სთ)	(104)
6.Geotrichum candidum	50	28 (სთ)	(105)
7.Miceliophtora thermophile	65	170 (სთ)	(66,101)
8.Cheatomium thermophile	70	75 (წთ)	(65)

ეროვნული ბიბლიოთეკა

როგორც წარმოდგენილი ცხრილიდან სჩანს, M. thermophile-ის და C. thermophile-ს თერმოფილური სოკოების ენდოგლუკანაზები თერმომედეგობის მიხედვით ბერვად აღემატება ყველა ცნობილ მეზოფილურ ანალოგებს. ეს მონაცემები კიდევ ერთხელ მიუთითებენ თერმოფილურ სოკოებს შორის სელექციის მიზანშეწონილობაზე, რათა გამოვლენილ იქნა ენდოგლუკანაზების რაც შეიძლება უფრო თერმომედეგი ფორმები.

თერმოფილურ სოკოების ენდოგლუკანაზების უმრავლესობა ცნობილია მათ მიერ ქსილანის ჰიდროლიზის უნარით. ეს შეიძლება აიხსნას ორი აქტიური ცენტრის არსებობით, რომლებიც განაპირობებენ ენდოგლუკანაზურ და ენდოქსილანაზურ აქტივობებს (106). მეზოფილებისა და თერმოფილების ენდოგლუკანაზების უმრავლესობისათვის დადგინდა, რომ ცელობიოზა და გლუკოზა იწვევს მათი აქტივობების ინჰიბირებას (106-108). მაგრამ ზოგიერთ ნაშრომში ადგილი აქვს უკუეფექტს. ავტორები ამას იმით ხსნიან, რომ ენდოგლუკანაზების ამ ფორმებისათვის დამახასიათებელია ტრანსგლიკოზილირების რეაქცია.

მთელ რიგ შრომებში ნაჩვენები იქნა, რომ ენდოგლუკანაზების მრავალი ფორმა არ წარმოადგენს ერთი გენის ექსპრესიის პროდუქტებს, თუმცა ჰიპოთეზა შესაძლო პროტეოლიზური მოდიფიკაციის შესახებ მაინც რჩება ძალაში (109-112).

ზოგიერთი მოსაზრებებით ენდოგლუკანაზების მოლეკულებში ნახშირწყლოვანი ნაშთები წარმოადგენენ ფერმენტის ფუნქციონალურ ნაწილს. არსებობს შეხედულება იმის შესახებ, რომ თერმომედეგი ენდოგლუკანაზებისათვის დამახასიათებელია ნახშირწყლოვანი ნაშთების მაღალი შემცველობა (64).

მცირერიცხოვანია ლიტერატურული მონაცემები თერმოფილური სოკოების ცელულაზური კომპლექსის სხვა ფერმენტის - β-გლუკოზიდაზის შესახებ. რიგ შრომებში (6) ნაჩვენებია, რომ თერმოფილების β-გლუკოზიდაზა ხასიათდება

ეროვნული ბიბლიოთეკა

მაღალი თერმომედეგობით, მიუხედავად შედარებით დიდი მოლეკულური მასისა. შემუშავებულია Aspergillus wentii-ის კულტურალური სითხიდან ჰომოგენური β-გლუკოზიდაზის გამოყოფის მეთოდი (113). როგორც ნაჩვენები იქნა, მოლეკულური მასა 230000 ტოლია. ფერმენტი წარმოადგენს ჰექსომერს, რომელიც შედგება ექვსი სუბერთეულისაგან, რომელნიც განლაგებულნი არიან სამკუთხა ანტიპრიზმის წვერებში ორ ფენად (114). დადგინდა, რომ A. wentii-ის β-გლუკოზიდაზას აქვს უნარი აწარმოოს ცელულოზაშემცველი სუბსტრატების ხანგრძლივი ჰიდროლიზი 55° ტემპერატურაზე.

პროკარიოტების (ბაქტერიების) ცელულაზები ინარჩუნებენ აქტივობას 65° ტემპერატურაზე და უფრო მაღლაც, მაგრამ ნაკლებადაა ცნობილი მათი უნარი მოახდინონ ცელულოზის ჰიდროლიზი გლუკოზამდე. ამისათვის უკანასკნელ ხანებში გააქტიურდა კვლევა ბაქტერიული ცელულაზების პრაქტიკული მიზნებისათვის გამოყენების მიმართულებით. მაშასადამე, სოკოებისა და ბაქტერიების თერმომედეგი ენდოგლუკანაზების ცელობიოჰიდროლაზების, β-გლუკოზიდაზების ნებისმიერი ფორმების მოძიება, მათი მოლეკულური და კატალიზური მახასიათებლების დადგენა, რჩება როგორც თეორიული, ისე პრაქტიკული მნიშვნელობის ძირითად ამოცანად.

აღსანიშნავია, რომ Kyriacou-ისა და მისი თანაავტორების მიერ (115) T. reesei RUT-C30-ის ლიოფილიზებული კულტურალური სითხიდან იონცვლადი ქრომატოგრაფიის შედეგად გამოყოფილი იქნა ოთხი ფრაქცია, რომელიც იდენტიფიცირებული იყო შემდეგნაირად (მე-6 ცხრილი):

სუბფრაქცია ენდოგლუკანაზა -I დაყოფილი იყო თავის მხრივ ორ ფრაქციად პრეპარატული იზოელექტროფოკუსირებით. ერთი ფრაქცია ხასიათდებოდა 100 U/mg, მეორე კი 3 U/mg აქტივობით. ტურბოდიმეტრული ანალიზის საშუალებით ნაჩვენები იქნა, რომ ცელულოზის (Solka Floc-BW-40)-ის ჰიდროლიზური დაშლა დაბალმოლეკულურ ფრაგმენტებად შეუძლიათ მხოლოდ ენდოგლუკანაზებს, რასაც ახერხებს ენდოგლუკანაზა-I და

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ცხრილი №6

EG-I	30	2,4	0,06
EG-II	90,5	16	0,86
EG-III	100	24	0,93
CBH-I	2,1	0,4	0,52
U/mg	U/mg	U/mg	U/mg
	CMC	Xyl	pNplase

არა CBH-I. ამ ფერმენტით მჟავით გაჯირჯვებული ცელულოზის ჰიდროლიზმა აჩვენა, რომ ცელობიოზასთან ერთად მოხდა ცელოტრიოზის წარმოქმნაც.

Streptomyces lividans-დან გამოყოფილი ენდოგლუკანაზის გენი (116) სეკვენირებული იყო და შემდგომ გადატანილი E.coli-ში. ამ გენს აღმოაჩნდა საკმაოდ დიდი ჰომოლოგია Bacillus Sp-ის ენდოგლუკანაზის გენთან. დადგენილი იქნა მისი მოლეკულური მასა MW=46000, იზოელექტრული წერტილი pI=3,3, საწყისი აქტივობა 539 U/mg, რომელიც ისაზღვრებოდა აღმდგენელი შაქრებით კმც-ზე, ტემპერატურული ოპტიმუმი 50°c, ხოლო pH ოპტიმუმი-5,5; ფერმენტი ხასიათდებოდა შემდეგი ფიზიკო-ქიმიური მახასიათებლებით: მიხაელის- მენტენის მუდმივა Km=4,2 მგ/მლ, Vmax=24,9 U/mg. ავტორები მიუთითებენ, რომ აღნიშნული ენდოგლუკანაზები მიეკუთვნებიან ცელულაზების ოჯახს, რომელთა კლასიფიკაციაც აღწერილი იყო 1991 წელს Gilkes-ისა და თანაავტორთა მიერ (152).

მაღალი თერმომედეგობით ხასიათდებოდა ენდოგლუკანაზა, რომელიც სინთეზირდებოდა თერმოფილური სოკო Allesheria terrestris-ის მიერ. აღნიშნული მიკროორგანიზმი 40°c ტემპერატურაზე ზრდისას არ წარმოქმნიდა განსაკუთრებით თერმომედეგ ენდოგლუკანაზებს, ხოლო 48°c-ზე

ეროვნული ბიბლიოთეკა

კულტივირების პირობებში კი ასინთეზირებდა სხვა სახის ენდოგლუკანაზებს, რომლებიც განსხვავდებოდნენ მოლეკულური მასით და იზოელექტრული წერტილით. ავტორთა მიერ (117) დადგენილია, რომ აღნიშნულ თერმომედეგ ენგლუკანაზებს აქვთ იმუნოჯვარედული რეაქციის უნარი მეზოფილი კულტურა T. reesei-დან გამოყოფილი ენდოგლუკანაზის მიმართ მიღებულ ანტისხეულებზე, რაც მიუთითებს სტრუქტურულ ჰომოლოგიას ნაკლებად თერმომედეგ და თერმომედეგ ენდოგლუკანაზებს შორის.

Kristjansson-ის მიერ მიმოხილვით ნაშრომში (118) კარგად არის გარჩეული თერმომედეგი ფერმენტების წყაროები - თერმოფილური ორგანიზმები. აღნიშნულია, რომ თერმომედეგი ფერმენტები არიან პერსპექტიულნი მრეწველობის სხვადასხვა დარგებში, და არა მარტო კვების მრეწველობაში. როგორც ავტორი აღნიშნავს მომავალში დიდ ინტერესს წარმოადგენს თერმოფილური ორგანიზმების შესაბამისი გენების კლონირება მეზოფილებში, რამაც მისი აზრით უნდა გაზარდოს თერმოფილების გამოყენების არეალი ბიოტექნოლოგიაში. ნაშრომში წარმოდგენილია სხვადასხვა სახის ფერმენტების გამოყენების საკმაოდ საფუძვლიანი განხილვა ტექნოლოგიურ პროცესებში.

1989 წელს Moser-ისა და მისი თანაავტორების მიერ (119) Cellulomonas fimi-დან გამოყოფილი იქნა ორი ტიპის არაგლიკოზილირებული ენდოგლუკანაზა მოლეკულური მასებით 120000 და 130000. ორივე ენდოგლუკანაზის N-ბოლო ამინომჟავა აღმოჩნდა იდენტური. ავტორთა აზრით ამ ფერმენტებს ახასიათებთ სტრუქტურული მსგავსება.

1985 წელს Saddler-ისა და თანაავტორების მიერ მოყვანილია T. harzianum E58-ისა და T. reesei C30-ის ენდოგლუკანაზების შედარებითი დახასიათება (103). როგორც ავტორები აღნიშნავენ T. harzianum E58 წარმოქმნიდა β-გლუკოზიდაზურ და ენდოგლუკანაზურ უჯრედგარე აქტივობებს. T. reesei C30 პირიქით იძლეოდა მაღალ ენდოგლუკანაზურ და ფილტრის

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ქაღალდის აქტივობას უკრედშიგა ექსტრაქტში. ამ ორგანიზმების ფერმენტების ნახევრადინაქტივაციის დრო 50°C-ზე შეადგენდა 25სთ-ს. აღსანიშნავია, რომ T. harzianum E58 საბოლოო პროდუქტის სახით იძლეოდა 90% გლუკოზას, ხოლო T. reesei C30 კი 50-60%-ს.

უკანასკნელ ხანებში (120) გაჩნდა მონაცემები იმის შესახებ, რომ ოთხი სახის ენდოგლუკანაზას წარმოქმნიდა T. Koningii. სხვადასხვა სახის ქრომატოგრაფიული მეთოდებით გამოყოფილი იქნა ოთხივე ენდოგლუკანაზა. აღმოჩნდა, რომ მათ შორის ყველა შლიდა კმც-ს, H_3PO_4-ით გაჯირჯვებულ ცელულოზას, ცელოტეტრაოზას და ცელოპენტაოზას. აღნიშნული ენდოგლუკანაზების მოლეკულური მასები შეადგენდნენ 13 000, 48 000, 31 000 შესაბამისად, ხოლო მე-4 ენდოგლუკანაზის მასა არ იყო განსაზღვრული, თუმცა როგორც ავტორები აღნიშნავენ იგი იძლეოდა ერთ პიკს სეფადექს G-75-ზე. ავტორთა აზრით მისი მოლეკულური მასა დანარჩენების მასებთან მიახლოვებული უნდა იყოს (121).

საკმაოდ უჩვეულო მონაცემებია მიღებული ბაზიდიალური სოკოების ცელულაზების თერმოინაქტივაციის შესწავლის დროს. აქამდე ცნობილი იყო, რომ მაღალ ტემპერატურაზე (60°C) როგორც წესი, ფერმენტები განიცდიდნენ სწრაფ და უკუქცევად ინაქტივაციას. როგორც ამ ნაშრომის ავტორების მიერ არის აღნიშნული (122) ბაზიდიალური ენდოგლუკანაზები BW_1 და BH_1 60°C-ზე გაცხელებისას განიცდიდნენ აქტივაციას 80%-ით და 180%-ით საწყის აქტივობასთან შედარებით.

როგორც ბაქტერიული, ასევე სოკოების ცელულაზების გენეტიკური ასპექტები, მათი კლონირება და სტრუქტურული თავისებურებები დაწვრილებით არის განხილული Knowles-ისა და თანაავტორების მიმოხილვით ნაშრომში (123). აღნიშნულ ნაშრომში ავტორი დიდ უპირატესობას ანიჭებს სოკოვანი წარმოშობის ენდოგლუკანაზებს მათი მაღალი გამოსავლის გამო. ავტორს მოჰყავს ცელულაზური აქტივობის მქონე ათი ბაქტერიული ფერმენტის

ეროვნული ბიბლიოთეკა

და შვიდი სოკოვანი ფერმენტის კლონირების მაგალითი. საკმაოდ დაწვრილებითაა განხილული მათი ბიოსინთეზის თავისებურებანი. ნაჩვენებია აგრეთვე სხვადასხვა ფერმენტების ცალკეული უბნების გენეტიკური იდენტურობა. ნაშრომში მოყვანილია ცელულაზური ფერმენტების სტრუქტურის ჰიპოთეზური მოდელი. ავტორი დიდ მომავალს ანიჭებს აღნიშნული ტიპის ფერმენტების გამოყენებას.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ექსპერიმენტული ნაწილი

II თავი

კვლევის მასალები და მეთოდები

2.1. ცელულაზების პროდუცენტი ზოგიერთი მიცელიალური სოკოების საკვები არე, კულტივირების პირობები

კვლევის ობიექტებს წარმოადგენდნენ ცელულაზების პროდუცენტი მიცელიალური სოკოები: **Allesheria terrestris, Chaetomium thermophile, Aspergillus wentii, A. versicolor, A. terreus AT-490, Sporotrichum pulverulentum,** რომლებიც სელექციურად იყვნენ შერჩეულნი საქართველოს რესპუბლიკის მეცნიერებათა აკადემიის მცენარეთა ბიოქიმიის ინსტიტუტის ტიპიური მიკრომიცეტების კოლექციიდან.

რადგან ჩვენს მიერ, მაღალი ენდოგლუკანაზური თერმომედეგობის გამო, საბოლოოდ შერჩეული იყო თერმოფილური მიკრომიცეტი **Allesheria terrestris,** მოგვაქვს მხოლოდ მისი კულტივირების პირობები.

ცელულაზების მიღების მიზნით შტამებს **A. terrestris** და **Ch. thermophile** ვზრდიდით შემდეგი შემადგენლობის თხევად საკვებ არეზე გ/ლ(%): მიკროკრისტალური ცელულოზა LT_2-2; სიმინდის ექსტრაქტი-2; $(NH_4)_2SO_4$ - -0,13; KH_2PO_4-0,68; $MgSO_4 7H_2O$-0,05; $CaCl_2$-0,02; პეპტონი-0,15. საკვები არე მზადდებოდა ონკანის წყლით, საწყისი pH შეადგენდა 5,5.

შტამის კულტივირება ხდებოდა 250 მლ მოცულობის ერლენმეიერის კოლბებში, სადაც საკვები არე შეადგენდა 70 მლ, სანჯღრეველაზე (200ბრ/წთ), 40 დან -48°C-მდე ტემპერატურულ რეჟიმში 96 სთ-ის განმავლობაში. ფერმენტიორში კულტურის ზრდისათვის დადგენილი იქნა შემდეგი პირობები: იგივე საკვები არის შემადგენლობა და ტემპერატურული

ეროვნული ბიბლიოთეკა

რეჟიმები რაც ზევით არის მოყვანილი, სტერილური ჰაერი მიეწოდებოდა. კულტურალური სითხის ტოლი რაოდენობა 1წუთში, სანჯღრევველის ბრუნვა პირველ 24 საათში შეადგენდა 210 ბრ/წთ, მეორე 24 საათში 380-400ბრ/წთ, მესამეში 280-320 ბრ/წთ, ხოლო მეოთხე დღე-ღამის განმავლობაში 220-250 ბრ/წთ. ცდები ჩატარებულია "NEW BRASWICK"-ის (აშშ) 10-ლიტრიან ფერმენტიორში.

2.2 ცელულაზების ტექნიკური პრეპარატის მიღება

კულტივირების შემდეგ კულტურალური სითხის ფილტრატის ბიომასისაგან გამოსაყოფად, ფილტრად ვიყენებდით კაპრონის ბადის ფილტრს.

დალექვას ვაწარმოებდით 3,5 მოცულობის ეთილის სპირტის შერევით 4° ტემპერატურაზე. 10 წთ-ის დაყოვნების შემდეგ წარმოქმნილ ნალექს ვაგროვებდით ცენტრიფუგირებით და ვაშრობდით ლიოფილიზაციით ან ექსიკატორში +4°-ზე, ცენტრიფუგირებას ვაწარმოებდით 10 წთ-ის განმავლობაში 3000 ბრ/წთ-ის პირობებში.

2.3 ენდო-1,4-β-გლუკანაზის აქტივობის განსაზღვრა

ენდო-1,4-β-გლუკანაზის აქტივობას ვსაზღვრავდით ბეილის მეთოდით (124), ხოლო აღმდგენელი შაქრები ისაზღვრებოდა შომოდი-ნელსონის მეთოდით (125,126). სუბსტრატად გამოყენებული იყო Na-კარბოქსილმეთილცელულოზა (Na-კმც).

ეროვნული ბიბლიოთეკა

2.4 ცილის რაოდენობის განსაზღვრა

ცილის კონცენტრაციას ვსაზღვრავდით ბრედფორდის მეთოდით (127). ანალიზის მსვლელობა: 0,5 მლ საკვლევ ხსნარს ემატებოდა 0,5 მლ ბრედფორდის რეაქტივი, 20-30 წთ-ის შემდეგ ვზომავდით შთანთქმის ინტენსივობას 595 ნმ ტალღის სიგრძეზე.

საკალიბრო მრუდის ასაგებად სტანდარტად ვიყენებდით ხარის შრატის ალბუმინს („Reanal" უნგრეთი).

2.5. ფერმენტების თერმომედეგობის შესწავლა

ტექნიკური პრეპარატის და გაწმენდილი ენდოგლუკანაზების თერმომედეგობის შესასწავლად შემუშავდა მეთოდური მიდგომა, რომელიც მდგომარეობდა სუბსტრატის თანაობისას, დროის იმ მონაკვეთის განსაზღვრაში, როდესაც ფერმენტი გარკვეული ტემპერატურის პირობებში კარგავდა საწყისი აქტივობის ნახევარს ($\tau_{1/2}$).

რეაქტორში შეტანილ 200 მგ მკც-ს, რომელსაც ვაცხელებდით 65°-ზე აცეტატურ ბუფერში pH 4,5, უმატებდით ფერმენტულ ხსნარს. ნიმუშის აღება ხდებოდა გარკვეული დროის მონაკვეთებში, როდესაც ემპირიულად ჩანდა აქტივობის ვარდნა და ვსაზღვრავდით აღმდგენელ შაქრებს (128).

ცელულაზების თერმომედეგობის შესწავლა მიმდინარეობდა სუბსტრატის გარეშეც. ამისათვის ფერმენტულ ხსნარს ვაცხელებდით 65°-ზე წყლის აბაზანაში და დროის განსაზღვრული ინტერვალების შემდეგ ვზომავდით ნარჩენ აქტივობას. შედარებითი დახასიათებისათვის საწყის აქტივობას მივიჩნევდით 100%-ად, ხოლო ნარჩენი აქტივობების პროცენტულ მნიშვნელობებს ვითვლიდით საწყისთან შეფარდებით.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

2.6. ქრომატოგრაფია

ფერმენტის გაწმენდისთვის გამოყენებული იქნა აფინური და იონცვლადი ქრომატოგრაფია. სორბენტად ვიყენებდით მიკროკრისტალურ ცელულოზას (მკც), რომელსაც ვათავსებდით პოლიეთილენის ჭიქაში. ფერმენტული ხსნარის დამუშავება ხდებოდა წინასწარ 65° ტემპერატურაზე, 1,5სთ-ის განმავლობაში, რის შემდეგაც იგი ემატებოდა მკც-ს. ადსორბცია მიმდინარეობდა 18სთ-ის განმავლობაში. დესორბციას ვახდენდით 0,1მ-ის pH4,5 Na-ფოსფატური ბუფერით, დაბოლოს გამოხდილი წყლით.

იონცვლადი ქრომატოგრაფიისას მატარებლად ვიყენებდით ანიონცვლად DEAE-650M "Toyopearl"-ს (იაპონია). მატარებელი გაწონასწორებული იყო 0,06მ-ის pH7,6 Na-ფოსფატური ბუფერით. დესორბცია მიმდინარეობდა იონური ძალის წრფივი გრადიენტით 1მ NaCl-მდე, 23,5 მლ/სთ სიჩქარით.

2.7. SDS-გელ ელექტროფორეზი

საკვლევი ცილის ჰომოგენურობისა და მოლეკულური მასის განსაზღვრისათვის ვიყენებდით ფირფიტოვან ვერტიკალურ გელ-ელექტროფორეზს (129).

ვატარებდით ნატიურ და SDS-გელ ელექტროფორეზს სხვადასხვა პროცენტობის პოლიაკრილამიდის გელში. ბრომფენოლის ლურჯის მოძრაობის მიხედვით, რომელიც დამატებული ჰქონდა ნიმუშსა და მოწმეებს, თვალს ვადევნებდით ელექტროფორეზის მსვლელობას. ვაგებდით მოწმეების მოლეკულური მასების დამოკიდებულების გრაფიკს მათ გადაადგილებაზე, საიდანაც ვსაზღვრავდით საკვლევი ცილის მოლეკულურ მასას.

მოწმეებად ვიყენებდით ცნობილი მოლეკულური მასის ცილების ნაკრებს.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

2.8. იზოელექტროფოკუსირება

ფერმენტების იზოელექტრული წერტილის და მათი ჰომოგენურობის დასადგენად, ნიმუშებს ვსაზღვრავდით ანალიზური იზოელექტროფოკუსირებით პოლიაკრილამიდის გელის ფირფიტაზე ამფოლინების გრადიენტით 3,5-9,5 (130). მოწმეებად ვიყენებდით ცნობილი იზოელექტრული წერტილის მქონე ცილებს:

1- ამილოგლუკოზიდაზა pI 3,5,

2- სოიოდან გამოყოფილი ტრიპსინის ინჰიბიტორი pI 4,55,

3- ლაქტალბუმინი A pI 5,2,

4- კარბოანჰიდრაზა pI 6,55,

5- მიოგლობინი (მქავე ფორმა) pI6,85,

6- მიოგლობინი (ტუტე ფორმა) pI 7,35,

7- მიოგლობინი pI 8,15,

8- მიოგლობინი (საშუალო ფორმა) pI 8,45,

9- ლექტინი (ტუტე ფორმა) pI 8,45,

10- ტრიპსინოგენი pI 9,3.

იზოელექტრული წერტილი დადგენილი იყო მოწმეების და pH-ის გაზომვების მიხედვით.

2.9. ულტრაფილტრაცია

ცელულაზური პრეპარატის დასაკონცენტრირებლად და მარილების მოსაშორებლად ვიყენებდით ულტრაფილტრაციის მეთოდს. ფილტრაცია მიმდინარეობდა ღრუ ბოჭკოებში, რომელიც დამზადებული იყო კირიშის

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ОКБ-ТМБ-ს (რუსეთი) მიერ და ამიკონის ტიპის მემბრანულ ულტრაფილტრებზე. ამიკონის მემბრანული ფილტრის (PM-10) დიაპაზონი შეადგენდა 0 - 10000.

2.10. იმუნოქიმიური ანალიზი

ანტისხეულები T. reesei-ის ენდოგლუკანაზის მიმართ გადმოგვეცა ჰელსინკის ბიოტექნოლოგიური ცენტრიდან იმუნობლოტინგის ანალიზი ნიტროცელულოზაზე გადატანით „Western blotting" ჩატარებული იყო „Pharmacia" LKB-ს ხელსაწყოებზე. მეორადი ანტისხეულები მონიშნული იყო ტუტე ფოსფატაზით ტოვბინის მეთოდით (131). ამ სამუშაოების ჩასატარებლად გამოვიყენეთ Bio-Rad-ის რეაქტივები. მოლეკულური მასის მოწმეებად გამოვიყენეთ Blue Kit-ის წინასწარ შეღებილი ცილები ("Sigma").

2.11. ენდო-1,4-β-გლუკანაზის აქტივობის განსაზღვრა ზიმოგრამულად

გელში ენდოგლუკანაზური აქტივობის განსასაზღვრავად ვიყენებდით ბეგანის მეთოდს, რომელიც ემყარება Congo red-ის ურთიერთქმედებაზე კარბოქსილმეთილცელულოზასთან (132).

ანალიტიკურად დაყოფილი ცილების გელს ვაფენდით აგაროზაში პოლიმერიზებულ კმც-ს გელს. ინკუბაციის შემდეგ სუბსტრატიან გელს ვღებავდით Congo red-ის ხსნარით მეთოდის თანახმად. ამ მეთოდს ვიყენებდით ფერმენტის ინაქტივაციის დასადგენად საწყის ხსნარში,

ეროვნული ბიბლიოთეკა

რისთვისაც პარალელურ ბილიკზე შეგვქონდა ნატიური და ინაქტივირებული ფერმენტული ხსნარები. ზიმოგრამის შემდეგ ფირფიტაზე ნათლად ჩანდა აქტივობა შენარჩუნებული ფერმენტების მოქმედების ზონა.

2.12. ქსიღანაზური აქტივობის განსაზღვრა

ქსილანაზის აქტივობას ვსაზღვრავდით ბეილის მეთოდით (133), ხოლო აღმდგენელი შაქრები ისაზღვრებოდა შომოდი-ნელსონის მეთოდით. სუბსტრატად ვიყენებდით არყის ხის მერქნიდან გამოყოფილ ქსილანის 1%-იან ხსნარს 0,05მ Na-აცეტატურ ბუფერში pH 5,3.

2.13. A.niger-ის კულტივირება და გლუკოზოოქსიდაზის გამოყოფა

A.niger-ის კულტურას ვზრდიდით შემდეგი შემადგენლობის არეზე: $NaNO_3$; KH_2PO_4; $MgSO_4 7H_2O$ და საქაროზა. (134) კულტივირებას ვაწარმოებდით 90-96 სთ-ის განმავლობაში, 30°-ზე.

A.niger-ის მიცელიუმს ვრეცხავდით დისტილირებული წყლით და ვშლიდით ულტრაბგერით ან სრესვით. სრესვის დროს შეიძლება გამოყენებული იქნა შუშის ან ალუმინის ოქსიდის ფხვნილი.

დაშლილი მასიდან 2-3 სთ-ის განმავლობაში ვაწარმოებდით ექსტრაქციას 50 მლ, 0.5M აცეტატური ბუფერით pH-4,5, ვაცენტრიფუგირებდით 30 წთ-ის განმავლობაში 8000 ბრ/წთ პირობებში და ვუმატებდით 4-6°-ის პირობებში 50%-იან სპირტს 1:2.5 შეფარდებით. მიღებულ ხსნარს ვუმატებდით ამონიუმის სულფატს ფაზის წარმოქმნამდე. ხსნარი გადაგვქონდა დამყოფ ძაბრში და ვაყოვნებდით 12 სთ-ს.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

12 სთ-ის შემდეგ დამყოფი ძაბრიდან ვიღებდით ქვედა ფრაქციას, რომელსაც დიალიზით ან ულტრაფილტრაციით ვაშორებდით მარილებს, და ვატარებდით ქრომატოგრაფიულ სვეტში, რომელშიც მატარებლად ჩატვირთული იყო მკც, ხოლო ელუენტად ვიყენებდით 0,05M, pH-7,4 ფოსფატურ ბუფერს. ვაცალკევებდით ფრაქციებს რომელშიც იყო გლუკოზოოქსიდაზური აქტივობა. ამ ფრაქციებს ვაშორებდით მარილს დიალიზით ან ულტრაფილტრაციით და ვზომავდით პრეპარატის გლუკოზოოქსიდაზურ აქტიობას.

2.14. გლუკოზოოქსიდაზური აქტივობის განსაზღვრა

გლუკოზოოქსიდაზური აქტივობის განსაზღვრისათვის ვიყენებდით: 4,8 მლ 0,21მკმ ორთოდიანიზიდინის ხსნარს გახსნილს 0,05M აცეტატურ ბუფერში, pH 5,1, 1მლ ß-გლუკოზის 10%-იან წყალხსნარს, 0,2მლ 60 U/ml აქტივობის მქონე პეროქსიდაზის წყალხსნარს. ყველაფერს ამას კარგად ვურევდით და ვდგამდით წყლის აბაზანაში 35°-ზე 30 წუთის განმავლობაში. შემდეგ ორ კიუვეტაში ნაწილდებოდა სამ-სამი მილილიტრი ხსნარი. ერთს ემატებოდა 0,1მლ H_2O (საკონტროლო ხსნარი), ხოლო მეორეს ემატებოდა 0,1მლ საკვლევი ხსნარი. საკვლევი ხსნარის დამატებიდან 2 წუთის და 4 წუთის შემდეგ კონტროლის მიმართ ვზომავდით შთანთქმას 500ნმ ტალღის სიგრძეზე. აქტივობას ვთვლიდით ფორმულით (135):

$$\frac{[\Delta A_{500}/\Delta\tau]x3,1}{7,5x[R_E/V]}$$

ΔA_{500} 2 წუთში და 4 წუთში გაზომილ შთანთქმის მონაცემებს შორის სხვაობა.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

$\Delta\tau$ დროის სხვაობა ორ გაზომვას შორის წუთებში (2წუთი).

R_E შეტანილი საკვლევი ხსნარის მოცულობა მილილიტრებში.

V სარეაქციო არის მოცულობა.

2.15. პროტოპლასტების შერწყმა

უჯრედის გარსის დასაშლელად ვიყენებდით ლიზოციმს (<<Sigma>>,აშშ). უჯრედებს ვაგროვებდით ცენტრიფუგირებით (3000 ბრ/წთ, 15 წუთი) და ორჯერ ვრეცხავდით სტერილური ბუფერით - 1M სორბიტოლი 0,5M HEPES-ში (<<Sigma>>,აშშ), ვუმატებდით ფერმენტს გახსნილს იმავე ბუფერში (ფერმენტის კონცენტრაციაა 10მგ/მლ) და ვაყოვნებდით 4-საათს 30°C-ზე. მიღებულ ხსნარს ვფილტრავდით №3 ფილტრში.

პროტოპლასტებს ორჯერ ვრეცხავდით ცენტრიფუგირებით (3000 ბრ/წთ, 15 წთ) სტერილურ ბუფერში (1M სორბიტოლი 0,5M HEPES-ში). ნალექი გადაგვქონდა 1M სორბიტოლის და 10მკმ $CaCl_2$-ის ხსნარში 10მკმ Tris/HCl-ში pH 7,5, და ორჯერ ირეცხებოდა ამ ხსნარში ცენტრიფუგირებით (3000 ბრ/წთ, 15 წთ).

პროტოპლასტების შერწყმისათვის სტერილურ სინჯარაში შეგვქონდა 100-100 მკლ პროტოპლასტები. ვუმატებდით 1 მლ 30%-იან PEG 4000-ს და ვაყოვნებდით 10 წუთს ოთახის ტემპერატურაზე. შემდეგ ვთესავდით მყარ საკვებ არეზე პეტრის თასებში (13ნ).

სამუშაოს ძირითადი ნაწილი შესრულებულია საქართველოს რესპუბლიკის მეცნიერებათა აკადემიის დურმიშიძის სახელობის მცენარეთა ბიოქიმიის ინსტიტუტში. ნაშრომის ცალკეული ნაწილები დამუშავდა მოსკოვის ბიოქიმიის ინსტიტუტში (რუსეთი), შეფილდის უნივერსიტეტში (ინგლისი) და ჰელსინკის ბიოტექნიკურ ცენტრში (ფინეთი).

ეროვნული ბიბლიოთეკა

III თ ა ვ ი

კვლევის შედეგები და მათი განხილვა

3,1. Trichoderma reesei-ს მინორული თერმომედეგი და ძირითადი ენდოგლუკანაზების გამოყოფა და შესწავლა

უკანასკნელი 15-20 წლის მანძილზე პრაქტიკულ ენზიმოლოგიაში მიკრობული წარმოშობის ფერმენტების ზრდის ტენდენცია ნათლად გამოვლინდა. პირველ რიგში ეს იმით აიხსნება რომ მიკროორგანიზმები წარმოქმნიან თითქმის ყველა ცნობილ ფერმენტებს ან მათ ახლო მდგომ ჰომოლოგებს. მეორეს მხრივ მუტაგენეზის საშუალებით საგრძნობლად შეიძლება გაიზარდოს წარმოქმნილი ფერმენტის რაოდენობა ამა თუ იმ კულტურაში და ბოლოს გენური ინჟინერიის მეთოდებით შეიძლება თითქმის ნებისმიერი გენის დუბლირება ან ტრანსფორმაცია მიკრობულ ორგანიზმში. ყოველივე ეს მნიშვნელოვნად აიაფებს ფერმენტული პრეპარატის ღირებულებას და დიდ უპირატესობას ანიჭებს მიკრობული წარმოშობის ფერმენტების გამოყენებას.

ჩვენი კვლევის ობიექტი-მიკროკრისტალური სოკო T. reesei-ის ცელულაზების კარგად ცნობილი პროდუცენტია (67-69,71,72,97-100). როგორც ირკვევა ამ კულტურის გენეტიკური ინფორმაციის სპექტრი იმდენად ფართოა, რომ მხოლოდ მცირეოდენი იმ ფერმენტების არის დახასიათებული, რომელთა ბიოსინთეზის უნარიც შესწევს ამ კულტურას. დღეისათვის T. reesei-ის ცალკეული წარმომადგენლები ცელულაზების კლასიკურ პროდუცენტებად არიან აღიარებულნი.

პირველ ეტაპზე ჩვენს კვლევის მიზანს შეადგენდა შტამის მიერ წარმოქმნილ ფერმენტ ენდოგლუკანაზის თერმომედეგობის შესწავლა ამ მიზნისათვის ვაწარმოებდით ენდოგლუკანაზური პრეპარატების თერმულ

ეროვნული ბიბლიოთეკა

დამუშავებას 60-70° დიაპაზონში. თერმული დამუშავებისათვის ვიყენებდით ჩვენს მიერ სპეციალურად ამ მიზნისათვის შემუშავებულ სვეტისებურ რეაქტორს (კვლევის მასალები და მეთოდები).

იმ გარემოებამ, რომ სვეტისებურ რეაქტორში 65° ტემპერატურაზე გაცხელებისას, როდესაც T.reesei-ის ენდოგლუკანაზა მთლიანად ინაქტივირებულია, და მიუხედავად ამისა მკც-ზე ადსორბირებული ფრაქცია მაინც ხასიათდებოდა მცირე ენდოგლუკანაზური აქტივობით მიგვიყვანა იმ დაშვებამდე, რომ მეზოფილური კულტურა T.reesei-ის ცელულაზური კომპლექსი შეიძლება შეიცავდეს ენდოგლუკანაზის თერმომედეგ კომპონენტს. ამ ცდის მრავალჯერადმა გამეორეამ 60-70°-მდე ტემპერატურულ დიაპაზონში და ყველა შემთხვევაში ნარჩენი აქტივობის ერთმა და იგივე რაოდენობამ, რომელიც შეადგენდა საერთო აქტივობის 1,5-2,5%, მიგვიყვანა იმ დასკვნამდე რომ საქმე უნდა გვქონოდა მინორულ თერმომედეგ ენდოგლუკანაზის კომპონენტთან. მომავალში ჩვენ მიზნად დავისახეთ ამ კომპლექსიდან თერმომედეგი კომპონენტის გამოყოფა და დახასიათება.

გამოყოფის პირველ ეტაპად შევარჩიეთ აფინური ქრომატოგრაფია. მატარებლად გამოყენებული იყო მიკროკრისტალური ცელულოზა. ფერმენტული პრეპარატი კონცენტრაციით 1მგ/მლ, შეგვქონდა 8მლ მოცულობის სვეტში, რომლის ზომები იყო: d=2,5სმ, h=12სმ. ფრაქციას, რომელიც არ ადსორბირდებოდა მკც-ზე ვაშორებდით 0,01M-ის ფოსფატური ბუფერით pH7,5, ცილების დესორბცია მიმდინარეობდა ბუფერის იონური ძალის შემცირებით, ხოლო მკც-ზე მყარად ადსორბირებული ფრაქციისა-გამოხდილი წყლით (სურ.3). ენდოგლუკანაზური აქტივობის მიხედვით შერჩეულ ფრაქციას ვაშორებდით მარილებს UM-10 ტიპის მემბრანული ულტრაფილტრაციით და ვახდენდით მის იდენტიფიცირებას SDS-გელ ელექტროფორეზით (სურ.4).

ეროვნული ბიბლიოთეკა

გაწმენდის მომდევნო ეტაპს წარმოადგენდა იონცვლადი ქრომატოგრაფია. მატარებლად გამოვიყენეთ DEAE Toyopearl-HW650 (სურ.5). აფინური ქრომატოგრაფიის შედეგად მიღებული ენდოგლუკანაზური ფრაქცია მოცულობით 1მლ, და ცილის კონცენტრაციით 1მგ/მლ, შეგვქონდა სვეტში, რომლის ზომები იყო: d=1,5სმ და h=8სმ. ელუციას ვაწარმოებდით KCl-ის გრადიენტით 0,15მ-დან 1მ-მდე. ფრაქციების შერჩევა ხდებოდა ენდოგლუკანაზური აქტივობის მიხედვით, ხოლო აქტიური ფრაქციის იდენტიფიცირება SDS-გელ ელექტროფორეზით.

გაწმენდის მესამე ეტაპზე ვახდენდით საკვლევი ფრაქციის რექრომატოგრაფიას იგივე მატარებელზე DEAE Toyopearl HW-650-ზე, ვიყენებდით იგივე ბუფერულ სისტემებს. შეტანილი ცილის კონცენტრაცია შეადგენდა 0,5მგ/მლ (სურ.6). 65° ტემპერატურაზე გაცხელებისას, კმც-ს თანაობისას, მედეგობას ინარჩუნებდა პირველი ფრაქცია, რომელიც მიღებული იყო KCl-ის დაბალი იონური ძალით ელუციისას. მისი ელექტროფორეზით იდენტიფიცირებისას, დავადგინეთ, რომ ენდოგლუკანაზის თერმომედეგი კომპონენტის მოლეკულური მასა შეადგენდა 46 000 და წარმოადგენდა T.reesei-ის ფერმენტული პრეპარატის მინორულ კომპონენტს (სურ.7).

იზოელექტროფოკუსირების შედეგად დადგენილი იქნა იზოელექტრული წერტილი pI=5,2 (სურ.8).

გამოყოფილი მინორული კომპონენტი თერმომედეგობის მიხედვით შევადარეთ ამავე კულტურის ცნობილ ძირითად ენდოგლუკანაზას, რომელიც გაწმენდილი იქნა მინორული თერმომედეგი კომპონენტის გაწმენდის პროცესში. შევისწავლეთ ფერმენტის თერმოინაქტივაცია 65°, როგორც სუბსტრატის თანაობისას, ასევე სუბსტრატის გარეშე. ენდოგლუკანაზის მინორული კომპონენტის ნახევრადინაქტივაციის დრო, სუბსტრატის გარეშე შეადგენდა 100წთ-ს, მაშინ როცა იმავე პირობებში ჩვენს მიერ

ეროვნული ბიბლიოთეკა

გამოყოფილი ძირითადი კომპონენტისათვის-6წთ (სურ.10), ხოლო სუბსტრატის თანაობისას მინორული კომპონენტისათვის ეს დრო შეადგენდა 1440 წთ-ს (სურ.9), ძირითადი კომპონენტისთვის კი 60 წთ-ს.

მინორული კომპონენტის ფიზიკო-ქიმიურ თვისებებიდან მოლეკულური მასისა და იზოელექტრული წერტილის გარდა დავადგინეთ: მიხაელის-მენტენის მუდმივა K_M=1,8გ/ლ, ნახშირწყლების შემცველობა 28-29%.

რაც შეეხება ძირითად კომპონენტს მისი მოლეკულური წონა შეადგენდა 68000 (სურ.4), იზოელექტრული წერტილი 4,5, ხოლო მიხაელის მენტენის მუდმივა ტოლი იყო Km= 0,9 გ/ლ.

ამგვარად, ჩვენს მიერ ნაჩვენები იქნა, რომ Trichoderma reesei-ის ფერმენტული პრეპარატი შეიცავს ენდოგლუკანაზის მინორულ კომპონენტს, რომელიც გამოირჩევა განსაკუთრებული თერმომედეგობით.

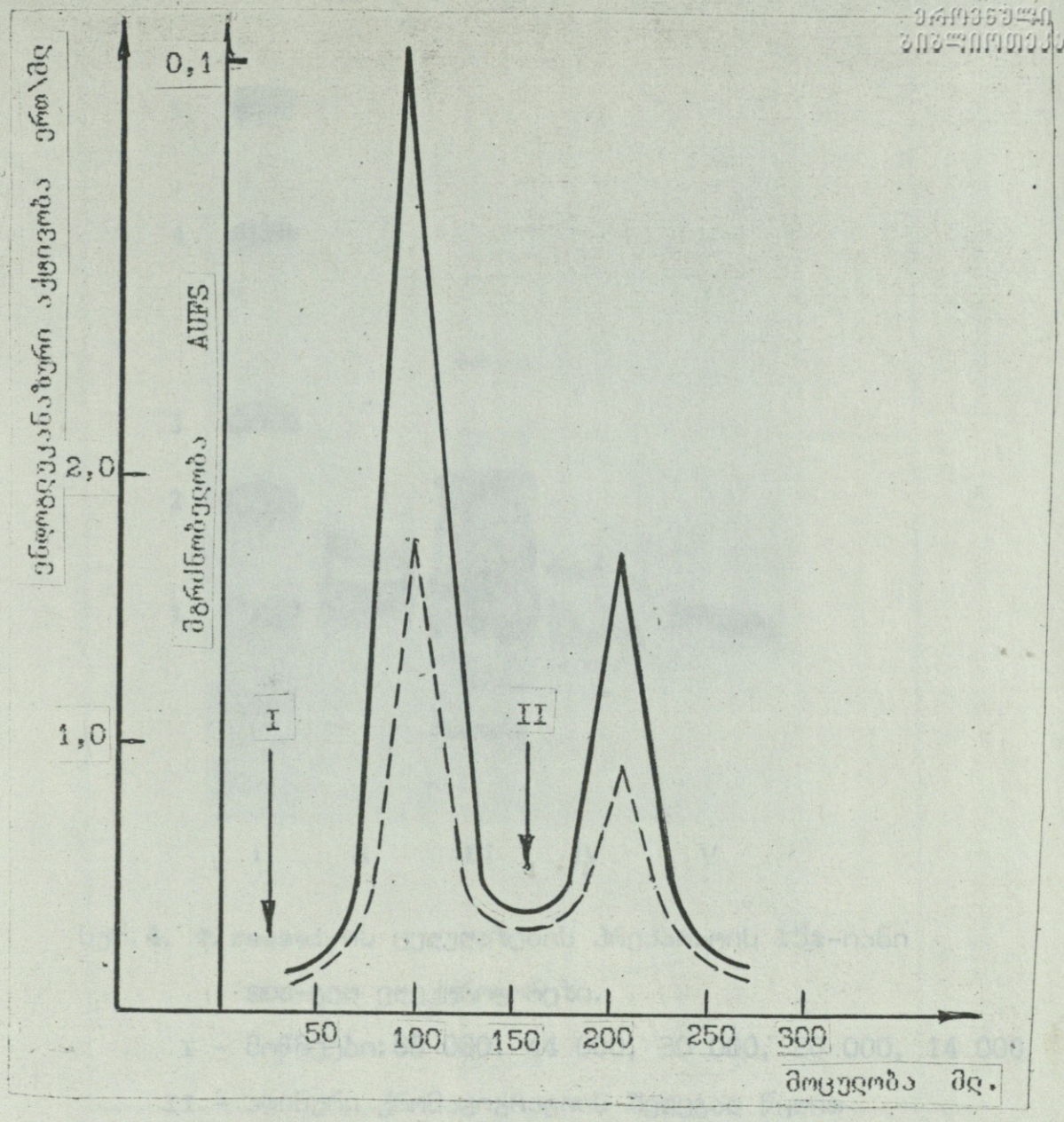
როგორც მე-4 სურათიდან ჩანს T.reesei-ს ძირითადი კომპონენტი გაიწმინდა მინორული კომპონენტის გაწმენდის ეტაპზე, აფინური და იონცვლადი ქრომოტოგრაფიების შემდგომ (სურ.3). მე 7 ცხრილში მოყვანილია ძირითადი და მინორული კომპონენტის ფიზიკო-ქიმიური მაჩვენებლები.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

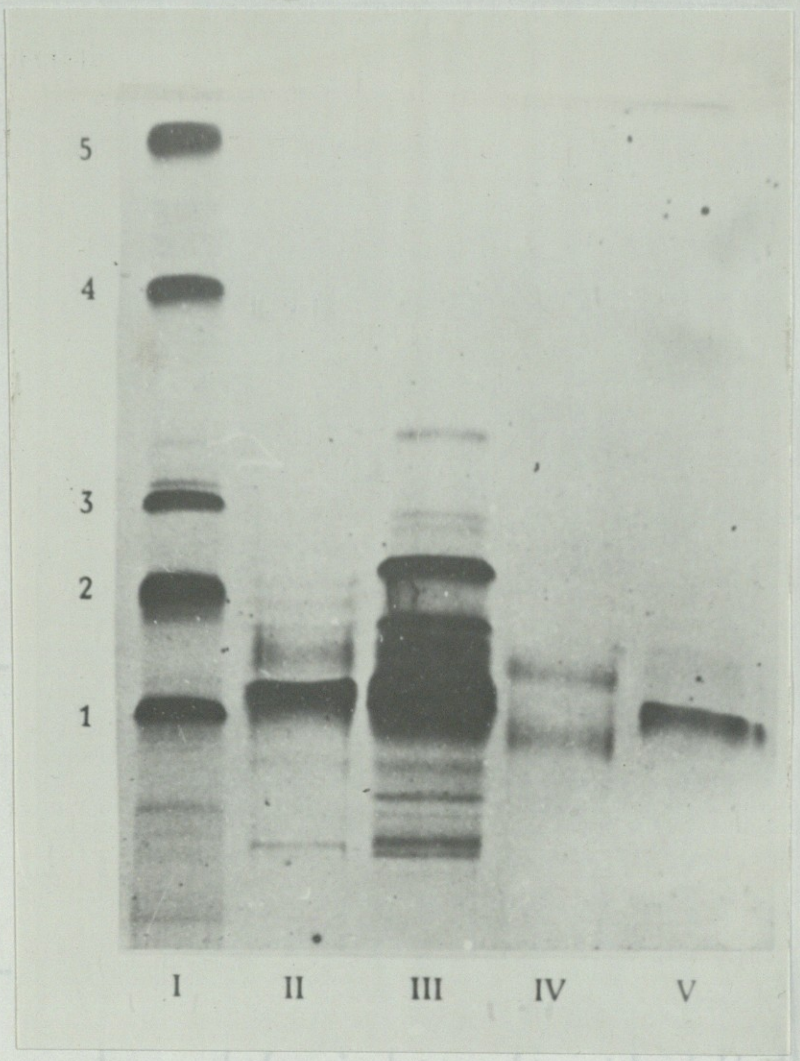
ცხრილი №7

კულტურა T.reesei-ის ენდოგლუკანაზის ძირითადი და მინორული კომპონენტების ფიზიკო-ქიმიური მაჩვენებლები

T.reesei-ს ენდოგლუკანა-ზები	აქტივობა კმცკ-აზა nkat/mg	მოლეკულ წონა MW	იზოელექტრ წერტილი pI	$\tau_{1/2}$ 65° წთ.	Km, გ/ლ
ძირითადი კომპ	300	68000	5,5	6	2,8
მინორული კომპ	250	46000	5,2	100	1,8



სურ.3. T.reesei-ის ფერმენტული პრეპარატის აფინური ქრომატოგრაფია.
ცდის პირობები: მატარებელი-მკც, სვეტის ზომები 2,5x12სმ;
ტემპერატურა +4°; ელუციის სიჩქარე 50მლ/სთ.
I - 0,01M-ის ფოსფატური ბუფერით, pH7,5 ელუციისას
მიღებული პრეპარატის არა ადსორბირებული ფრაქცია,
II - წყლით ელუციისას მიღებული ფრაქცია.



სურ.4. T.reesei-ის ცელულაზების პრეპარატის 15%-იანი SDS-გელ ელექტროფორეზი.

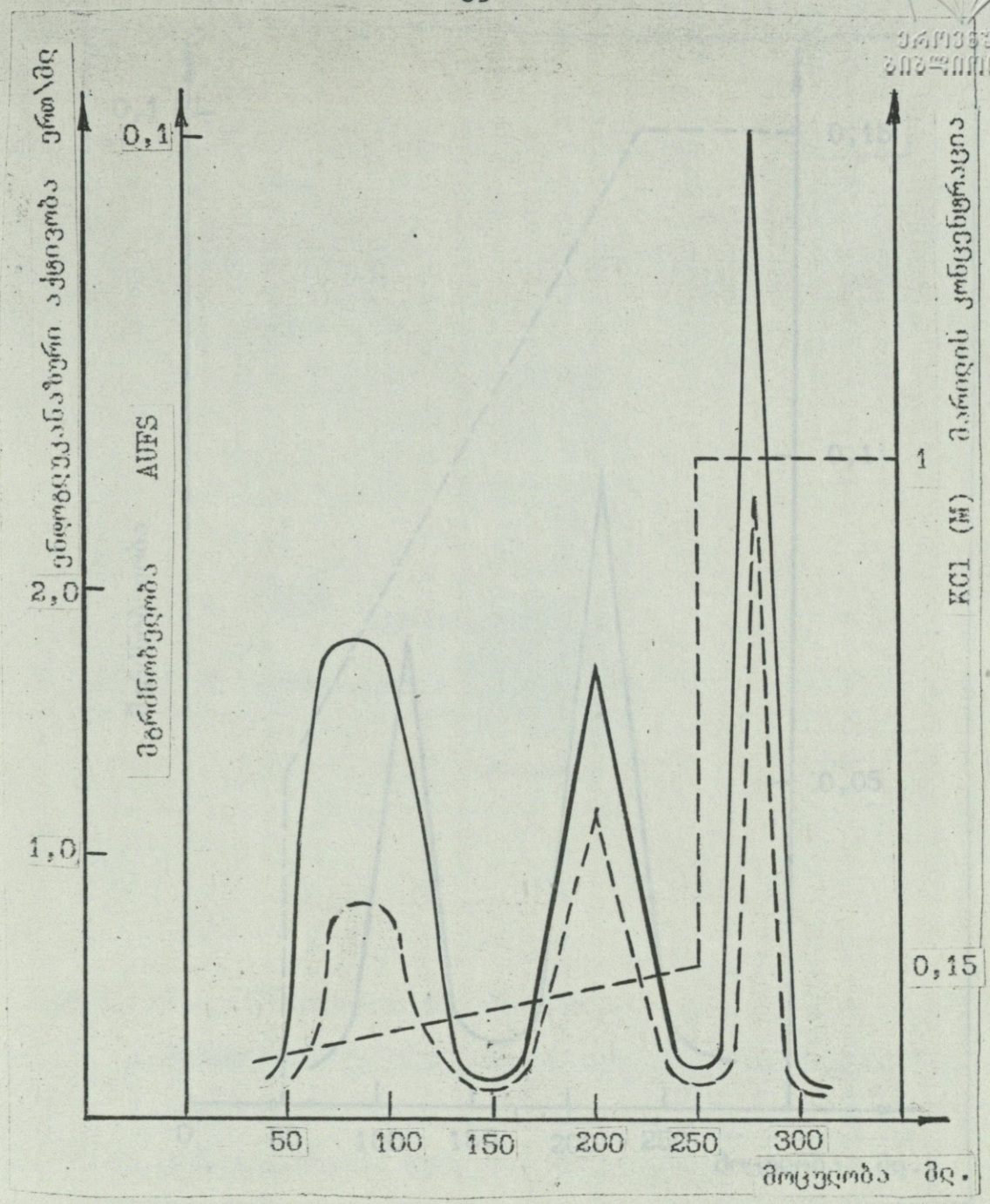
I - მოწმეები: 68 000, 44 000, 30 000, 20 000, 14 000

II - აფინური ქრომატოგრაფიის შედეგად წყლით დესორბციისას მიღებული ფრაქცია,

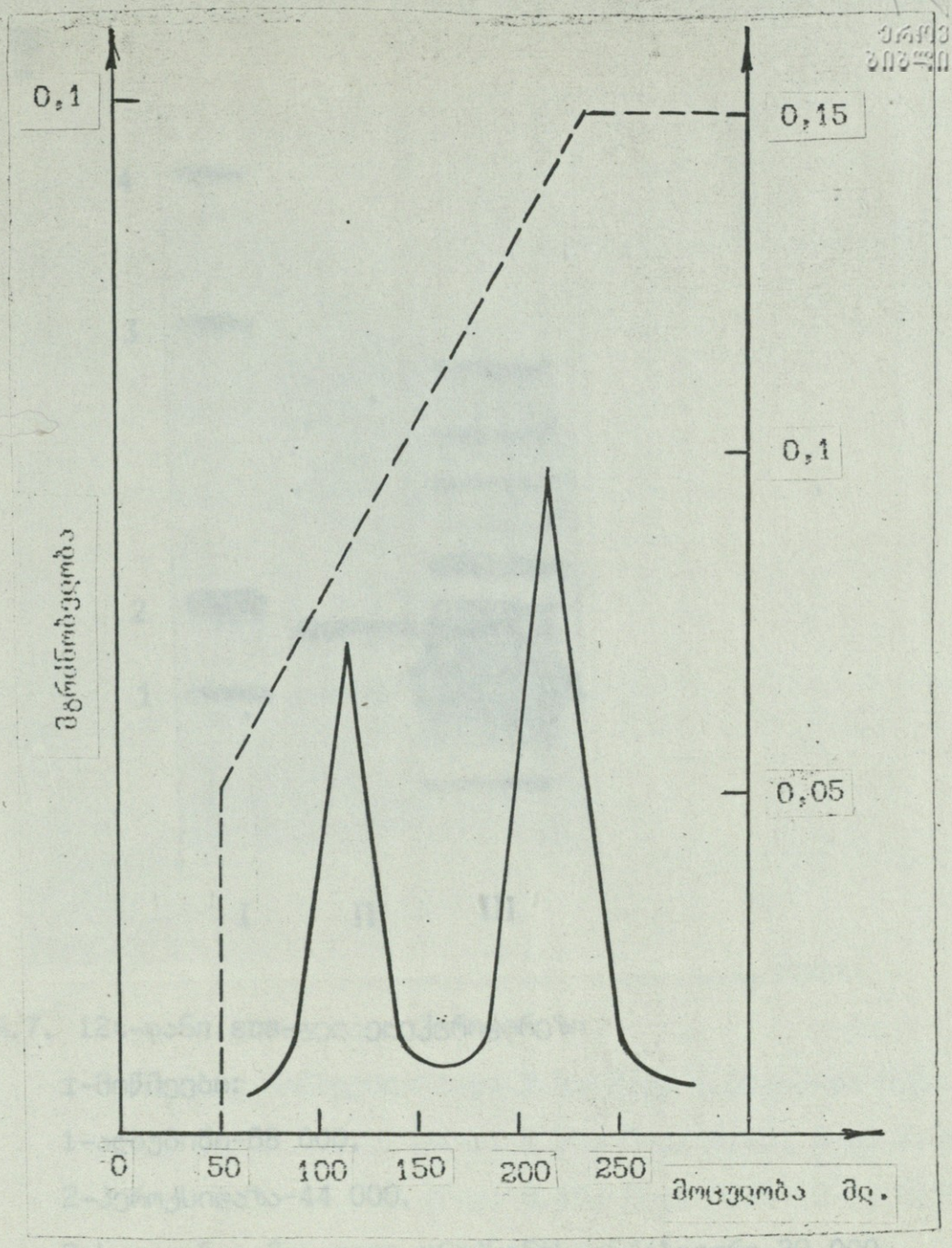
III - საწყისი პრეპარატი,

IV - იონცვლადი ქრომატოგრაფიისას მიღებული მედეგი ფრაქცია,

V - T.reesei-ის პრეპარატის ენდოგლუკანაზის ძირითადი ფორმა

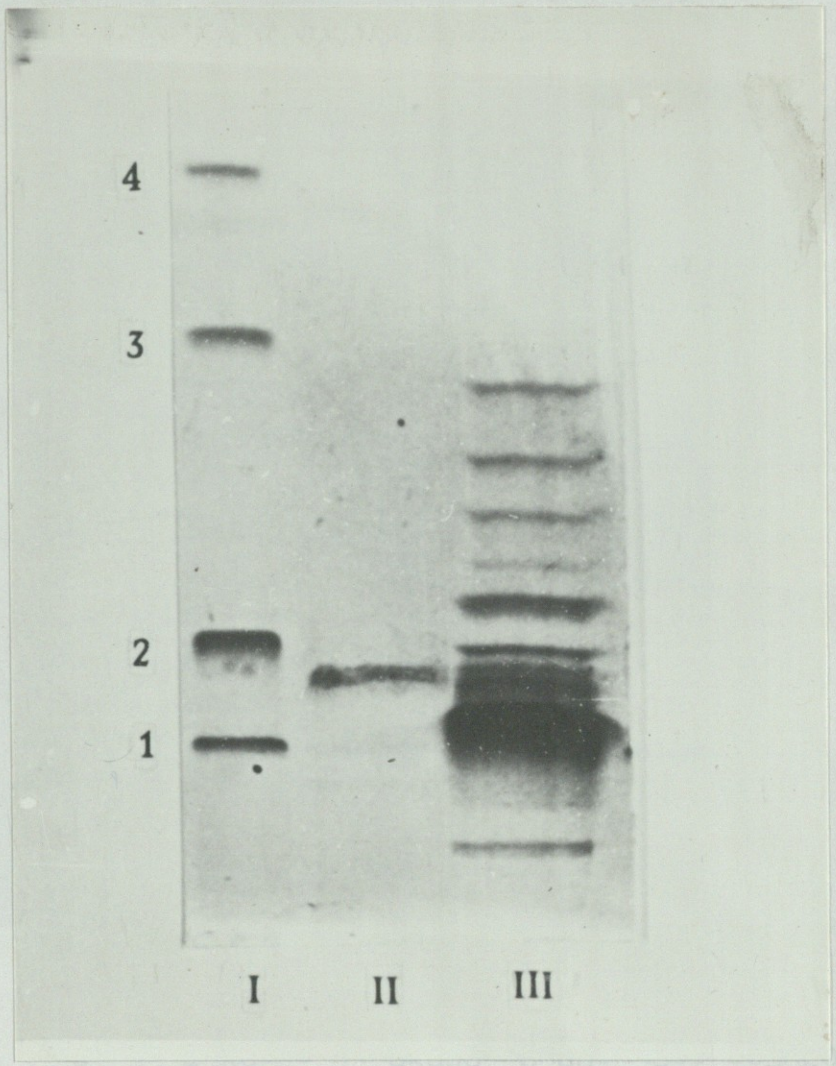


სურ.5. აფინური ქრომატოგრაფიის შედეგად მიღებული თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის ფრაქციის იონცვლადი ქრომატოგრაფია. ცდის პირობები: სვეტის ზომები 1,5x8,0სმ, ციოლის კონცენტრაცია 1მგ/მლ, ელუციის სიჩქარე 50 მლ/სთ. გრადიენტული ელუცია KCl-ის ხსნარით 0,15M-დან 1M-მდე.



სურ. 6. თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის ფრაქციის
რექრომატოგრაფია DEAE Toyopearl HW-650-ზე.
ცდის პირობები: ბუფერული სისტემები იგივეა რაც
მე-5 სურათის შემთხვევაში, ხოლო გრადიენტული
ელუცია KCl-ის ხსნარით ჩატარდა 0,05M-დან 0,15M-მდე.

ეროვნული ბიბლიოთეკა



სურ.7. 12%-იანი SDS-გელ ელექტროფორეზი

I-მოწმეები:

1-ალბუმინი-68 000,

2-პეროქსიდაზა-44 000,

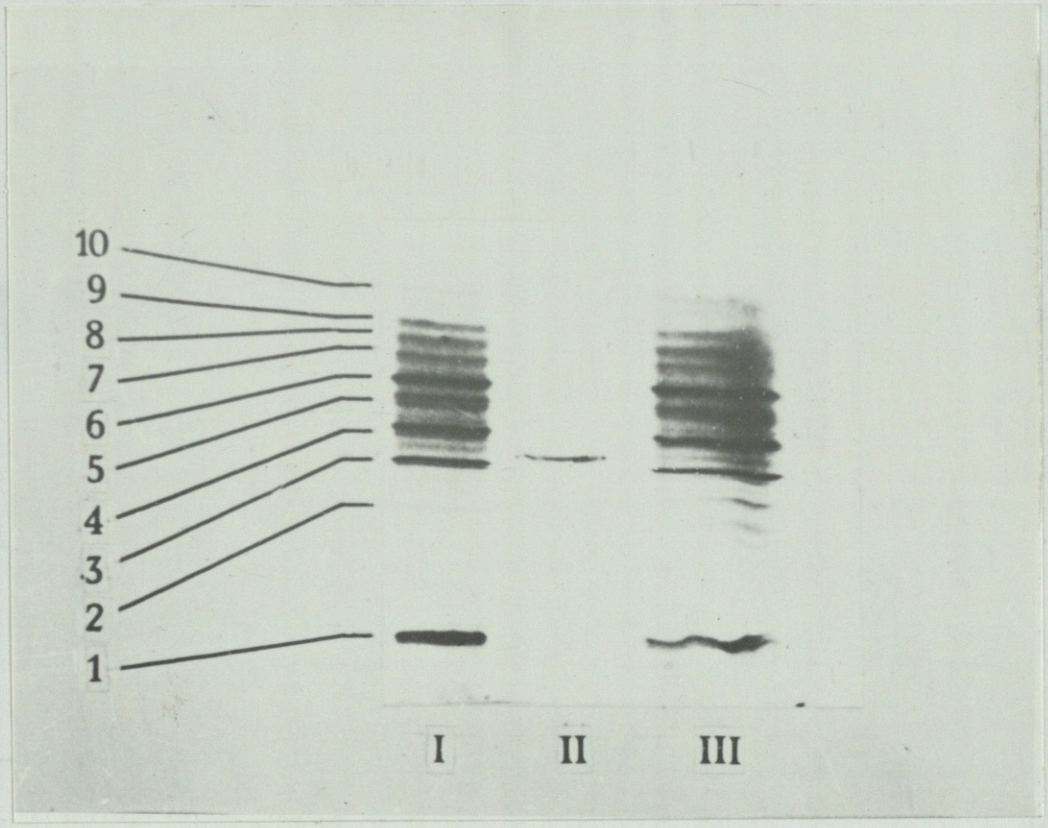
3-სოიოდან გამოყოფილი ტრიპსინის ინჰიბიტორი-20 000,

4-ლიზოციმი-14 000.

II-გაწმენდილი მინორული თერმომედეგი ენდოგლუკანაზა,

III-საწყისი ფერმენტული პრეპარატი.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

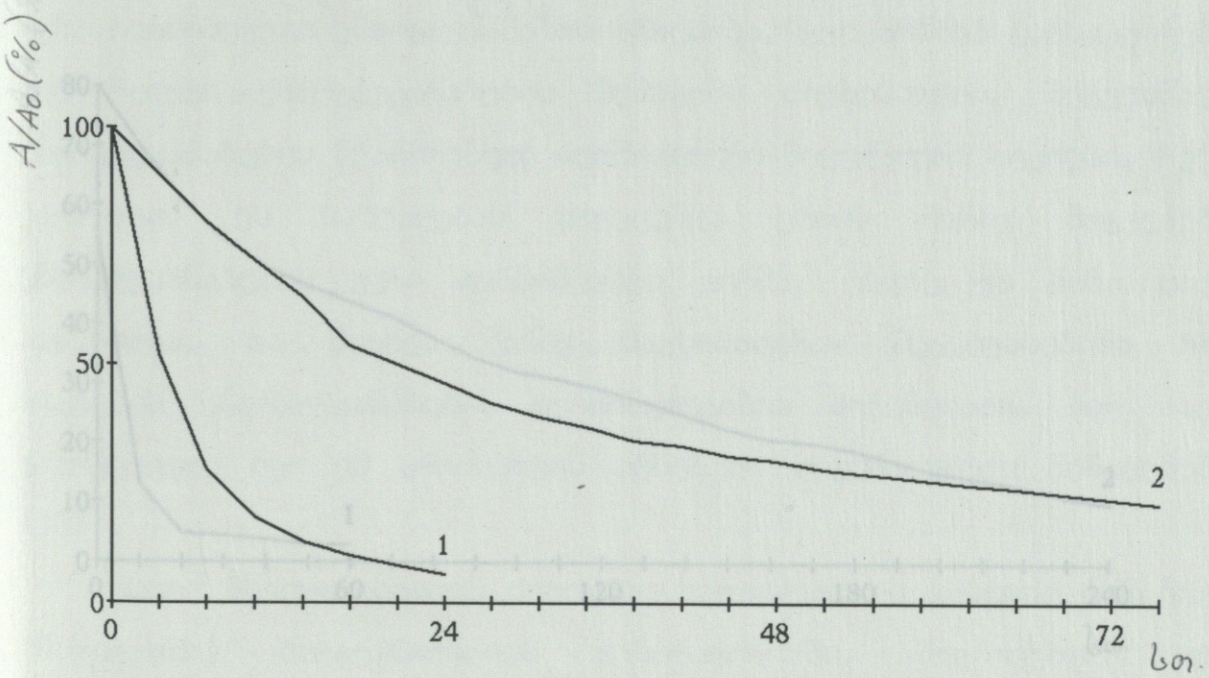


სურ.8. ცილების იზოელექტროფოკუსირება ამფოლინების გრადიენტით 3,5-9,5.

I-მოწმეები: 1-pI 3,5; 2-pI 4,55; 3-pI 5,2; 4-pI 6,55; 5-pI 6,85; 6-pI 7,35; 7-pI 8,15; 8-pI 8,45; 9-pI 8,55; 10-pI 9,3.

II-გაწმენდილი მინორული თერმომედეგი ენდოგლუკანაზა

III-მოწმეები.

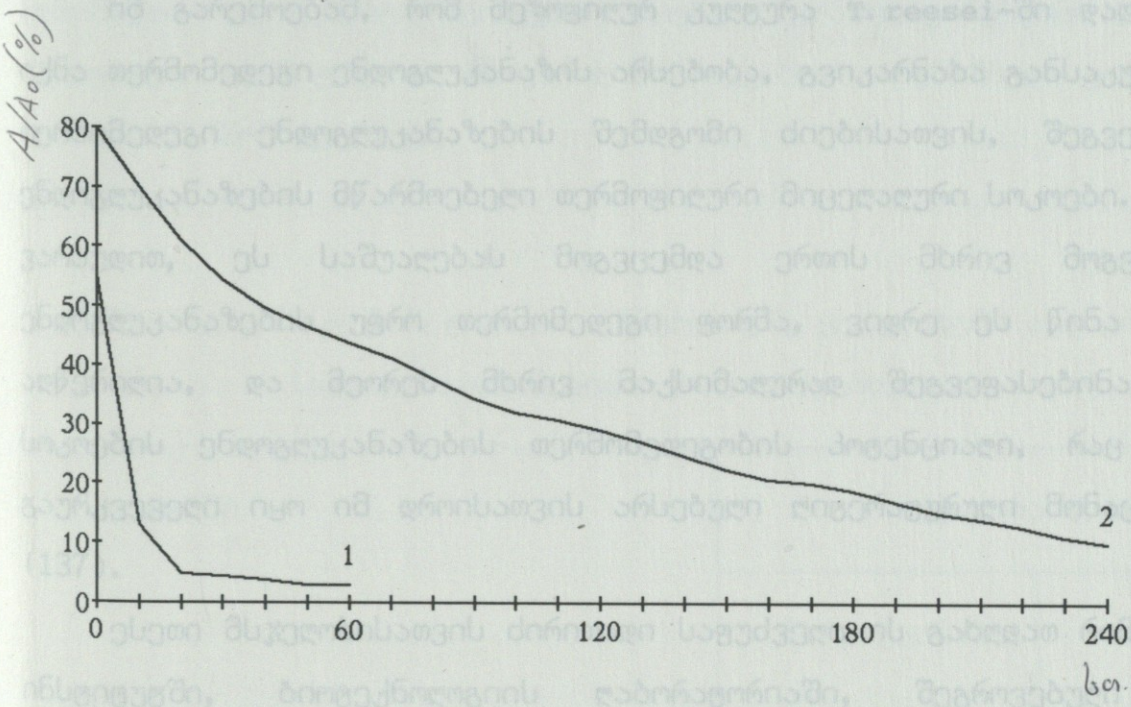


სურ. 9. T. reesei-ის ენდოგლუკანაზების ძირითადი და მინორული თერმომედეგი კომპონენტების თერმოინაქტივაცია 65°-ზე სუბსტრატის თანაობისას.

ცდის პირობები: 0,1M აცეტატური ბუფერი pH 4,5; სვეტის ზომები 2,0* 8,0 სმ, სუბსტრატი მკც, ნიმუშებს ვიღებდით ყოველ 24 სთ-ში,

1-ძირითადი ენდოგლუკანაზური კომპონენტი

2-მინორული თერმომედეგი ენდოგლუკანაზა.



სურ. 10. თერმომედეგი და ძირითადი ენდოგლუკანაზების თერმოინაქტივაცია 65° სუბსტრატის გარეშე.

ცდის პირობები: ფერმენტის კონცენტრაცია 0,01 მგ/მლ; კმც-სუბსტრატის კონცენტრაცია 0,75%; ინკუბაციის ტემპერატურა 40°; 0,05M აცეტატური ბუფერი pH 4,5; აქტივობა იზომებოდა ვისკოზიმეტრიულად.

1-ძირითადი ენდოგლუკანაზური კომპონენტი

2-თერმომედეგი ენდოგლუკანაზა.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

3.2. თერმომედეგ ენდოგლუკანეზების პროდუცენტ თერმოფილური მიცელალური სოკოების შერჩევა

იმ გარემოებამ, რომ მეზოფილურ კულტურა T. reesei-ში დადგენილი იქნა თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის არსებობა, გვიკარნახა განსაკუთრებით თერმომედეგი ენდოგლუკანაზების შემდგომი ძიებისათვის, შეგვესწავლა ენდოგლუკანაზების მწარმოებელი თერმოფილური მიცელალური სოკოები. ჩვენი ვარაუდით, ეს საშუალებას მოგვცემდა ერთის მხრივ მოგვეძებნა ენდოგლუკანაზების უფრო თერმომედეგი ფორმა, ვიდრე ეს წინა თავში აღწერილია, და მეორეს მხრივ მაქსიმალურად შეგვეფასებინა ობის სოკოების ენდოგლუკანაზების თერმომედეგობის პოტენციალი, რაც ასევე გაურკვეველი იყო იმ დროისათვის არსებული ლიტერატურული მონაცემებით (137).

ესეთი მსჯელობისათვის ძირითადი საფუძველი ის გახლდათ რომ ჩვენს ინსტიტუტში, ბიოტექნოლოგიის ლაბორატორიაში, შეგროვებული არის საქართველოს სხვადასხვა ნიადაგობრივ კლიმატური ზონებიდან გამოყოფილი 3000-ზე მეტი სოკოს კულტურა (138), 30-მდე თერმოფილური მიცელალური სოკოს კულტურა მიღებული იყო ყოფილი საბჭოთა კავშირის, აშშ-ს, გერმანიის და ფინეთის კვლევითი დაწესებულებებიდან. სულ სკრინინგი ჩატარდა 70-მდე თერმოფილურ სოკოს კოლექციაში სადაც ჩვენს ამოცანას წარმოადგენდა მხოლოდ განსაკუთრებულად თერმომედეგი ენდოგლუკანაზების გამოყოფა და შესწავლა. სკრინინგი ჩატარდა შემდეგი ჯიშების მიცელალურ სოკოებში: **Alternaria, Allesheria, Sporotrichum, Chaetomium, Trichoderma, Aspergillus** და **Trichotecium**, აღნიშნული სოკოები აშკარად გამოხატული თერმოტოლერანტობით ხასიათდებოდნენ, იზრდებოდნენ 45°-მდე მიკროკრისტალურ ცელულოზაზე და წარმოქმნიდნენ უჯრედგარეშე ცელულაზებს სხვა და სხვა შეფარდებით. აღსანიშნავია ის გარემოებაც რომ

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ამ კოლექციიდან ზოგიერთი კულტურა (10-ზე მეტი) კარგად იზრდებოდა 55-60° ტემპერატურულ რეჟიმში ისეთ ადვილად მეტაბოლიზირებად სუბსტრატზე როგორიც არის გლუკოზა. ყოველივე ეს მიუთითებს იმაზე რომ აღნიშნული კულტურები შეიძლება იყვნენ კლასიფიცირებულნი როგორც ობლიგატური თერმოფილები. №8 ცხრილში მოყვანილია აღნიშნული კოლექციის ტიპიური წარმომადგენლები.

ცხრილი №8

თერმოფილური სოკოების ტიპიური უჯრედგარეშე ცელულაზური აქტივობები

(აქტივობა იზომებოდა ვისკოზიმეტრიულად)

შტამი	აქტივობა U/ml	
	ენდოგლუკანაზა	Na-კმც
T.reesei	5,5	8,2
S.thermophile	0,95	0,85
A. terrestris	3,3	1,7
A. terrestris 62260	0,9	1,13
C.thermophile	1,5	1,7
C.termophile AX-B	2,4	3,7

ამ ცხრილში მოყვანილია იმ პროდუცენტების აქტივობები რომელნიც კულტივირებულია 40° პირობებში. შემდგომი სელექციისათვის ჩვენ გადავწყვიტეთ პროდუცენტების კულტივირება უფრო მაღალ ტემპერატურაზე გაგვეგრძელებინა. ეს იმით იყო გამოწვეული რომ თერმომედეგი

ეროვნული ბიბლიოთეკა

კომპონენტის დეტექტირებაც, გამოყოფას რომ თავი დავანებოთ, საკმაოდ რთულია. ამიტომ ჩვენ ვივარაუდეთ რომ, ის კულტურები რომლებიც მიკრიკრისტალურ ცელულოზაზე, როგორც ერთადერთ ნახშირბადის წყაროზე, უფრო მაღალ ტემპერატურულ რეჟიმში გაიზრდებოდნენ წარმოქმნიდნენ უფრო თერმომედეგ ენდოგლუკანაზებსაც.

ამ მიზნით კულტურებს ვზრდიდით 40,45,48° ტემპერატურებზე. 40-45° ტემპერატურულ ინტერვალში ყველა ჩვენს მიერ გამოკვლეული ცელულაზების პროდუცენტი თერმოფილები წარმოქმნიდნენ დამახასიათებელ აქტივობებს მკც-ზე ზრდისას. მე-9ცხრილში ჩვენი კოლექციიდან მოყვანილია ის პროდუცენტები, რომლებისთვისაც დამახასიათებელია ყველაზე უფრო მაღალი უჯრედგარე ენდოგლუკანანზური აქტივობები 45°-ის პირობებში.

ცხრილი №9

45°-ზე გაზრდილი კულტურების ცელულაზური აქტივობები

შ ტ ა მ ე ბ ი	ენდოგლუკანაზური აქტივობა U/ml		აღმდგენელი შაქრ. (ფ.ქ.), mkm/min	
	მკც	გლუკოზა	მკც	გლუკოზა
Allesheria terrestris	4,23	0,29	0,24	0,03
Cheatomium thermophile	4,11	0,16	0,28	0,02
Aspergillus wentii	0,05	0,04	0,2	0
Aspergillus terreus	0,24	0,34	0	0
Aspergillus versicolor	0,1	0,2	0,15	0
Sporotrichum pulverulentum	1,9	0,05	0,14	0

როგორც აღნიშნული იყო ამ ტემპერატურულ დიაპაზონში (40-45°) იზრდებოდა ყველა კულტურა, თუმცა შედარებით კარგი ზრდით ხასიათდებოდნენ **A.Terrestris**-სი და C.Thermophile.

კვლევის ეს ნაწილი ჩატარებული იყო **"New Brunswick"**-ის ფირმის

ეროვნული ბიბლიოთეკა

(აშშ) თერმოსტატირებულ სანჯრევეელაზე, რომელიც საშუალებას იძლევა ერთი გრადუსი ტემპერატურის ცვლილებაც ზუსტად დაგვეფიქსირებინა.

კვლევის შემდეგი ეტაპი ითვალისწინებდა 46-50° ტემპერატურულ რეჟიმში ზრდას, რომლის მიმართაც მდგრადი აღმოჩნდა მხოლოდ ორი კულტურა: **Allesheria terrestris** და **Chaetomium thermophile.** მე-10 ცხრილში ნაჩვენებია ამ პროდუცენტის ენდოგლუკანაზური და ფილტრის ქაღალდის აქტივობები 48-49° ტემპერატურის პირობებში, ნახშირბადის წყაროდ გამოყენებული იყო მკც.

დანარჩენი კულტურებისათვის ამ პირობებში დამახასიათებელი იყო ძალზედ სუსტი ზრდა და ისინი პრაქტიკულად არ წარმოქმნიდნენ უჯრედგარე ცელულაზურ აქტივობებს, ამიტომ ისინი შემდგომი კვლევისათვის აღარ გამოგვიყენებია.

ვინაიდან, კულტურა **A.terrestris** ამჟღავნებდა უფრო მაღალ ენდოგლუკანაზურ აქტივობას ზრდის ყველა მაღალი ტემპერატურული რეჟიმის დროს, ეს კულტურა შერჩეული იქნა როგორც თერმომედეგი ცელულაზების ძირითადი პროდუცენტი.

ცხრილი №10

კულტურების ენდოგლუკანაზური აქტივობები 48-49°-ის კლტივირების პირობებში. (აქტივობები გაზომილია ვისკოზიმეტრიულად)

შ ტ ა მ ე ბ ი	ენდოგლუკანაზური აქტივობა (U/ml	ფილტრის ქაღალდის აქტივობა (mkm/min)
Allesheria terrestris	1,9	0,15
Chaetomium thermophile	1,2	0,07

ეროვნული ბიბლიოთეკა

შემდგომ ეტაპზე შემოწმებული იქნა A.terrestris-ის ენდოგლუკანაზების თერმომედეგობა იმ კულტურალურ სითხეებში, რომლებიც მიღებულ იქნენ სხვადასხვა ტემპერატურულ პირობებში კულტივირებისას. მე-11 სურათზე წარმოდგენილია A.terrestris-ის 40,45 და 48° ტემპერატურულ პირობებში მიღებული ენდოგლუკანაზების თერმოინაქტივაცია პასტერიზაციის პირობებში 65°. როგორც სურათის მონაცემებიდან ჩანს 3-საათისთვის 1-მრუდი, რომელსაც შეესაბამება 40°-ზე კულტივირების პირობებში მიღებულ ენდოგლუკანაზას მთლიანად და უკუქცევადათ კარგავს აქტივობას. ამ დროისათვის 45° პირობებში მიღებული ენდოგლუკანაზა (2 მრუდი) ინარჩუნებს აქტივობის თითქმის 20%, ხოლო 48° კულტივირების პირობებში მიღებული ენდოგლუკანაზის საწყისი აქტივობის თითქმის 70%. მჟღავნდება. ამასთან ყურათსაღებია ისიც რომ ნახევრადინაქტივაციის დრო τ 1/2, 48° ზრდის პირობებში მიღებული ენდოგლუკანაზისათვის შეადგენს 6 საათს, ხოლო 40° მიღებულისათვის 45წთ. რომ დავრწმუნებულიყავით იმაში რომ, მაღალ (48°) ტემპერატურაზე კულტივირებისას, საქმე გვაქვს თვისობრივად ახალ ცილასთან, საჭირო იყო დამაჯერებელი შედეგების მიღება. ამ მიზნით, ცდების შემდეგი სერია მიეძღვნა იმას რომ 40 დან 49°-ის ჩათვლით თითო გრადუსით გავზარდეთ კულტურის საინკუბაციო არის ტემპერატურა. ყველა გრადუსის მომატებით ვლინდებოდა ენდოგლუკანაზის თერმომედეგობის ზრდა, დაახლოვებით ისევე როგორც ეს №11 სურათზეა წარმოდგენილი. ძალზედ დიდმა სხვაობამ თერმომედეგობაში, 40° და 48-49°-ების კულტივირებისას მიღებულ ენდოგლუკანაზებს შორის, მოგვცა საშუალება გვევარაუდა რომ ამ შემთხვევაში ნამდვილად თვისობრივად ახალ ცილასთან გვქონდა საქმე.

გარდა ამისა, იგივე პირობებში კულტივირებისას Allesheria terrestris-ი ხასიათდებოდა ნორმალურად დეტექტირებადი ქსილანაზური აქტივობით. მე-12 სურათზე ნაჩვენებია სხვადასხვა ტემპერატურაზე გაზრდილი

ეროვნული ბიბლიოთეკა

Allesheria terrestris-ის კულტურალური სითხის ქსილანაზური აქტივობის ვარდნა 65°-ზე ინკუბაციისას.

ამ სურათის მონაცემებიდან ჩანს რომ ქსილანაზის თერმოინაქტივაცია მიმდინარეობს ანალოგიურად ენდოგლუკანაზის თერმოინაქტივაციისა (სურ.11). როგორც არ უნდა იყოს, ე.ი. ენდოგლუკანაზური და ქსილანაზური აქტივობები ეკუთვნიან ერთსა და იმავე ფერმენტს თუ სხვა და სხვას, ამ სურათის მონაცემები კიდევ ერთხელ ამტკიცებენ ჩვენს ვარაუდს, რომ ტემპერატურის აწევის დროს უნდა წარმოიქმნებოდეს ახალი ცილა.

მე-11 ცხრილში მოყვანილია 48°-ზე გაზრდილი კულტურა A.terrestris-ის ფერმენტული აქტივობები.

ცხრილი №11

A. terrestris-ის აქტივობები 48° -ის კულტივირების პირობებში

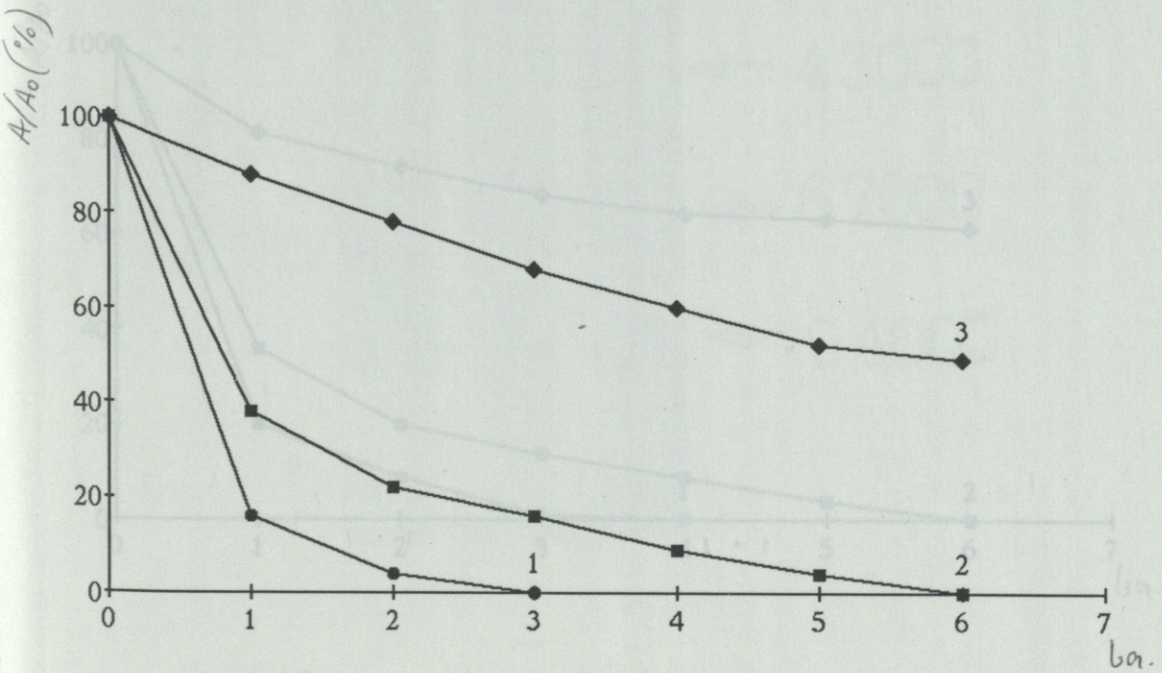
შ ტ ა მ ი	ცილის კონცენტ. (მგ/მლ)	ენდოგლუკანაზური აქტივ. (nKat/mg)	ქსილან. აქტ (nKat/mg)
Allesheria terrestris	0,07	14,55	3,81

იმისათვის რომ დაგვედგინა თუ როგორ იცვლებოდა სხვადასხვა ტემპერატურაზე კულტივირების ცილოვანი სპექტრი შევადარეთ ამ ტემპერატურებზე (40 და 48°)კულტურის მიერ სინთეზირებული ცილები SDS-გელ-ელექტროფორეზით (სურ.13). ვინაიდან SDS-გელ-ელექტროფორეზის საშუალებით არ ხერხდებოდა გელში აქტივობის დადგენა, გამოვიყენეთ ანალიტიკური იზოელექტროფოკუსირება ზიმოგრამულად, ენდოგლუკანაზური აქტივობის განსასაზღვრავად (სურ.14).

13-ე და მე 14-ე სურათების მონაცემები, ე.ი. 40 და 48°

ეროვნული ბიბლიოთეკა

პირობებში გაზრდილი კულტურის ფილტრატების ცილოვანი სპექტრები, საგრძნობლად განსხვავდებოდნენ როგორც 12%-იანი SDS-გელ ელექტროფორეზით, ასევე ცილების იზოელექტროფოკუსირებით ამფოლინების გრადიენტში. ზემოთ მოყვანილი მონაცემები, ასევე მიუთითებენ იმაზე რომ ტემპერატურის აწევით არა მარტო ითრგუნება არსებული ცილების სინთეზი, არამედ ხდება ახალი ცილების წარმოქმნა.

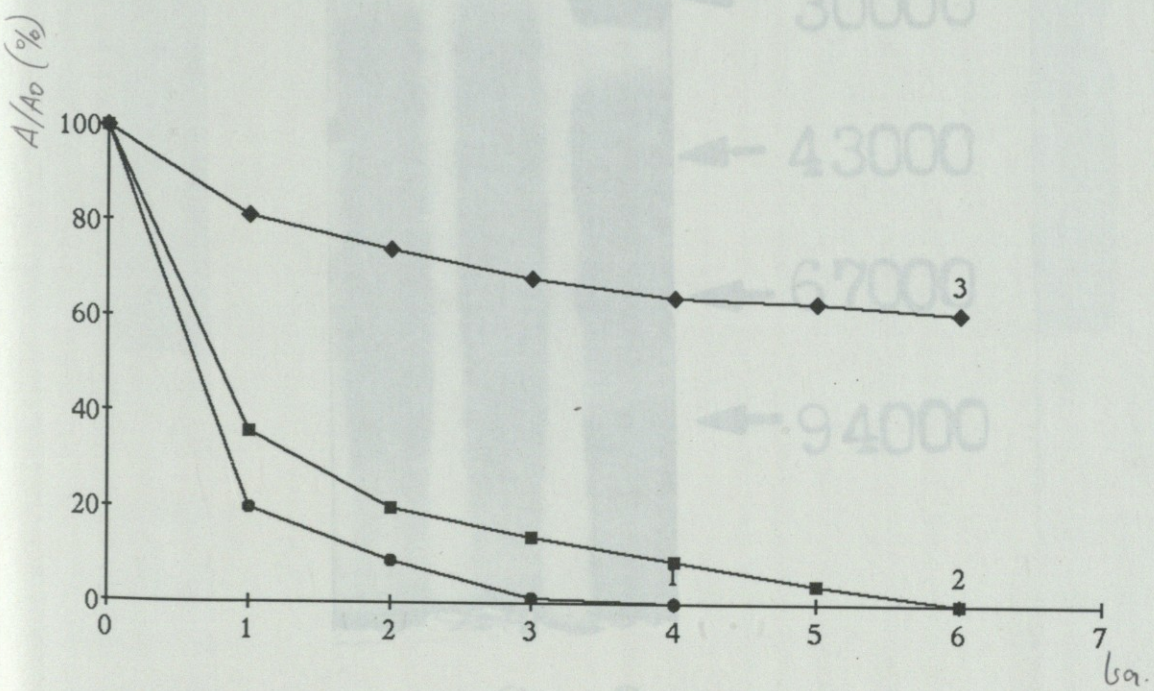


სურ. 11. სხვადასხვა ტემპერატურაზე გაზრდილ A. terrestris-ის კულტურალური სითხის ენდოგლუკანაზების თერმოინაქტივაცია 65°-ზე, სუბსტრატის გარეშე. ცდის პირობები: სუბსტრატი-კმც კონცენტრაციით 10მგ/მლ, ინკუბაციის ტემპერატურა 50°, 0.05M აცეტატური ბუფერი pH4,5.

I-40°-ზე გაზრდილი

II-45°-ზე გაზრდილი,

III-48°-ზე გაზრდილი.



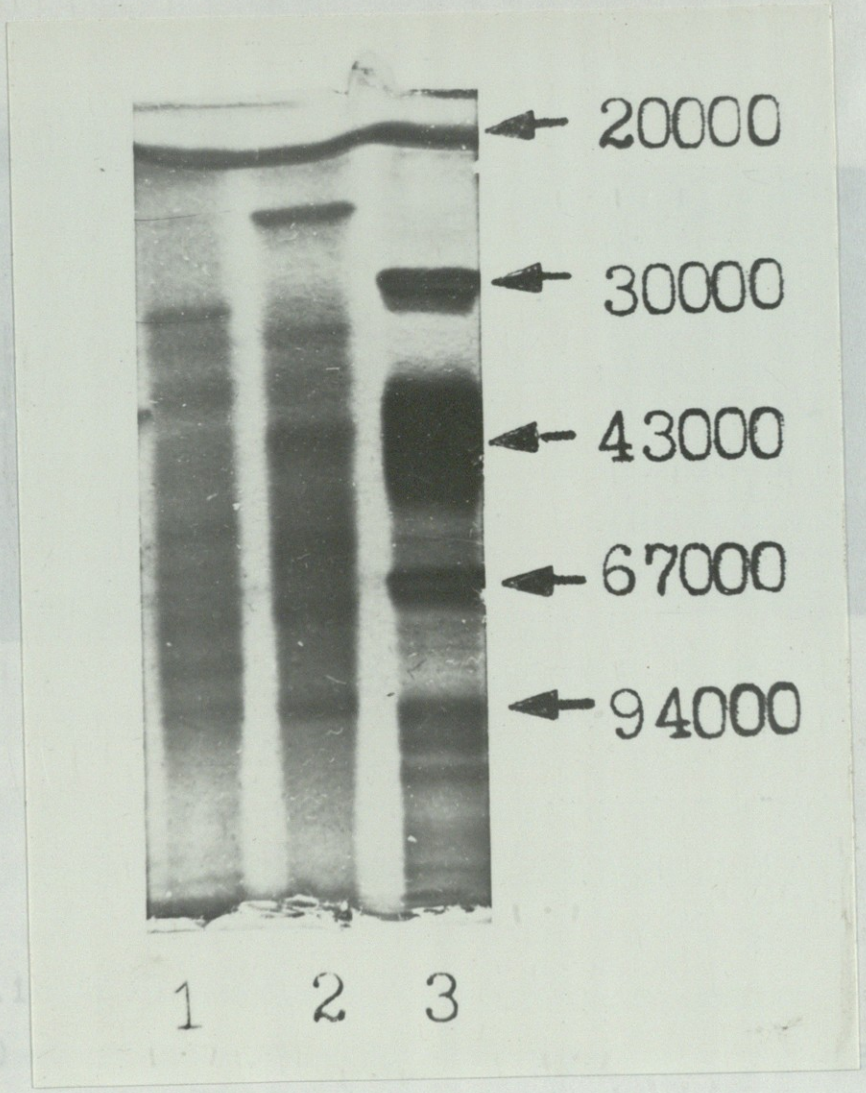
სურ. 12. სხვადასხვა ტემპერატურაზე გაზრდილი A. terrestris-ის კულტურალური სითხის ქსილანაზური აქტივობის ვარდნა 65°-ზე ინკუბაციისას.

ცდის პირობები: სუბსტრატი-ქსილანი კონცენტრაციით 10მგ/მლ 0,05M Na-აცეტატური ბუფერი pH5,3, ინკუბაციის ტემპერატურა 50°. ინკუბაციის დრო 5წთ.

I-40°-ზე გაზრდილი

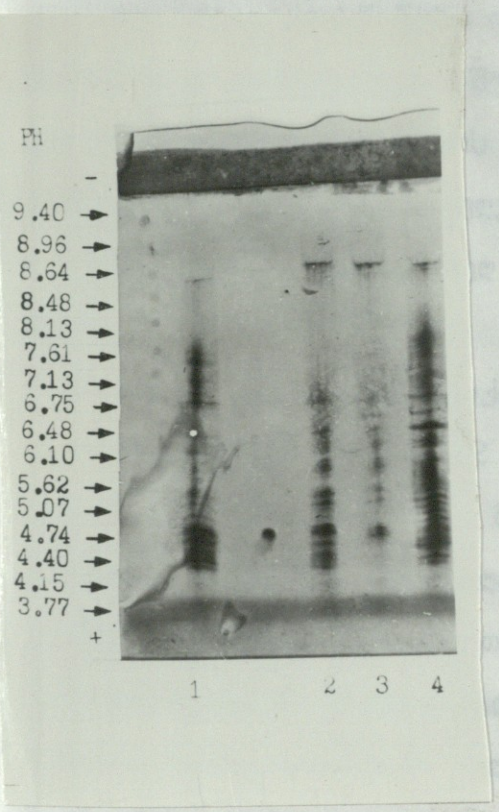
II-45°-ზე გაზრდილი,

III-48°-ზე გაზრდილი.

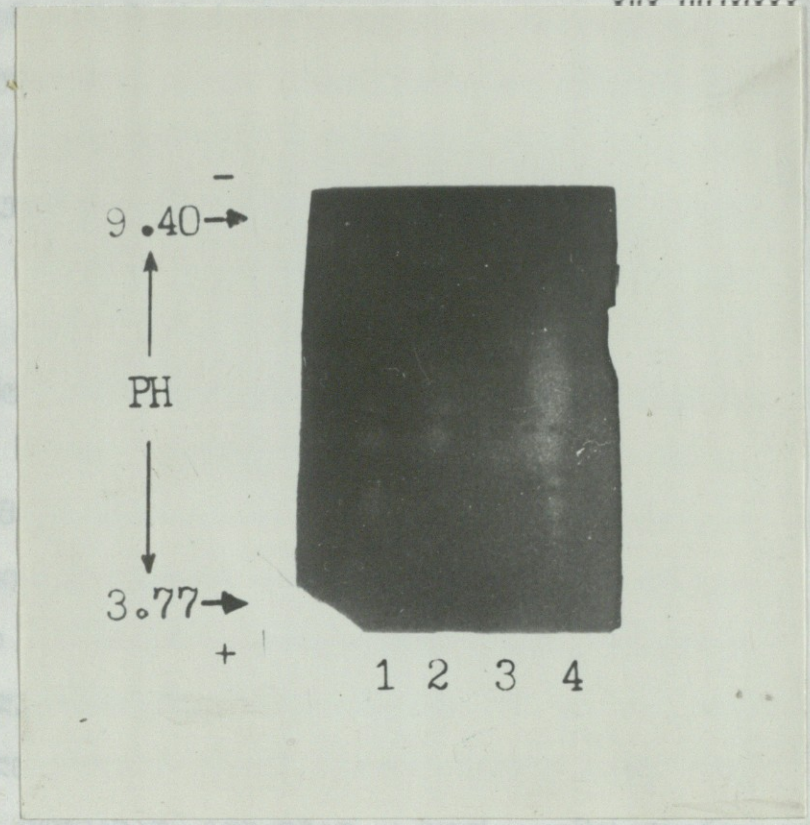


სურ. 13. 12%-იანი SDS-გელ ელექტროფორეზი. თერმოფილური სოკო Allesheria terrestris-ის მიერ სხვადასხვა ტემპერატურაზე სინთეზირებული ცილები: 1-48°-ის პირობებში, 2-40°-ის პირობებში, 3-მოწმეები:

ეროვნული ბიბლიოთეკა



ა



ბ

სურ. 14. A. terrestris-მიერ სინთეზირებული ცილების

ა) იზოელექტროფოკუსირება ამფოლინების გრადიენტით 3,5-10,0

ბ) იზოელექტროფოკუსირებიდან გადაღებული ზიმოგრამა

ა) და ბ) სურათებისათვის ბილიკების თანმიმდევრობა

დაცულია შემდეგნაირად:

1-48°-ზე გაზრდილი კულტურის ფილტრატი,

2-ნსთ-ის განმავლობაში 65°-ზე დამუშავებული ნიმუში (1),

3-ნსთ-ის განმავლობაში 65°-ზე დამუშავებული ნიმუში (4),

4-40°c -ზე გაზრდილი კულტურის ფილტრატი.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

თუ გავითვალისწინებთ იმ გარემოებას რომ კულტურა A.terrestris-ი, თერმომედეგი ცელულაზების შედარებით ახალი პროდუცენტია და პრაქტიკულად არაფერი იყო ცნობილი მის კულტივირების პირობებზე. ჩვენ ამოცანად დავისახეთ შეგვესწავლა ცელულაზების ბიოსინთეზის ინდუცირებადი ბუნება და დაგვედგინა, თუ რომელ ნაერთს გააჩნია საუკეთესო ინდუქტორული თვისებები.

აღსანიშნავია ის ფაქტი რომ კულტურა A.terrestris-სი მკც-ზე კულტივირების ბოლოს (60-72 საათი) როგორც ჩანს (სურ 15) გარდაქმნიდა მას მხოლოდ გლუკოზათ. რაც მიუთითებს იმაზე რომ კულტურალურ ფილტრატში მძლავრი ცელულოზის დამშლელი ფერმენტები გამოიყოფოდა. მაღალი წნევის ქრომოტოგრაფიული ანალიზით (სურ.16) დადასტურდა რომ ფილტრატი ნახშირწყლებიდან მხოლოდ გლუკოზას შეიცავდა. ალბათ იმ ფაქტს, რომ კულტურა A.terrestris-ი კულტივირების 60-65 საათის შემდეგ 4-6% -იან მიკროკრისტალურ ცელულოზას მთლიანად გლუკოზად აქცევს, იმის გარდა რასაც საკვებად იყენებს (1-1,5%), შეიძლება ტექნოლოგიური გამოყენებაც ჰქონდეს. განსაკუთრებით იმ შემთხვევაში როცა დელიგნიფიცირებული ცელულოზის ჰიდროლიზია საჭირო.

A.terrestris-ის ზრდის ოპტიმალური პირობების შესარჩევად, კერძოდ ნახშირბადის წყაროს დასადგენად გამოყენებული იყო მონო და დისაქარიდების შემდეგი ნაერთები: გალაქტოზა, სორბიტოლი, ქსილოზა, რამნოზა, მანოზა, ცელობიოზა, ლაქტოზა და საქაროზა. თვითვეული მათგანი შეგვქონდა არეში 2%-ის რაოდენობით. დისაქარიდები შეიცავენ როგორც α-ტიპის ბმების (მალტოზა, საქაროზა), ისე β-ტიპის ბმებს (ლაქტოზა, ცელობიოზა).

აღნიშნულ შაქრებში ყველაზე კარგი შედეგი მოგვცა ქსილოზამ. სწორედ ამიტომ, ქსილოზა იყო არჩეული, როგორც ცელულაზების ინდუქტორი და შემდეგ ცდებში სრული ნახშირბადის წყაროს დასადგენად დავაყენეთ

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ცდების შემდეგი ვარიანტები, სადაც შედარებისათვის ვიხმარეთ მიკროკრისტალური ცელულოზაც:

1) მიკროკრისტალური ცელულოზა

2) მიკროკრისტალური ცელულოზა + ქსილოზა

3) ქსილოზა

4) მიკროკრისტალური ცელულოზა + ქსილოზა 48 საათის შემდეგ

ეს უკანასკნელი იმიტომ გაკეთდა, რომ 48 საათის განმავლობაში ორგანიზმი ვერ წარმოქმნის საგრძნობ უჯრედგარეშე ფერმენტულ აქტივობებს და ძირითადად ხდება მიცელიუმის მასის დაგროვება. აღნიშნული ცდის ანალიზები მოყვანილია ცხრილ N12-ში, რომლებიც შედარებული იყო ელექტროფორეტიკულად (სურ 17).

როგორც ამ სურათის მონაცემებიდან ჩანს, ყველა შემთხვევაში A.terrestris-ი წარმოქმნიდა უჯრედ გარეშე ცილებს, მაგრამ ეტყობა ქსილოზის დამატების შემთხვევაში უფრო ინტენსიურად წარმოიქმნებოდნენ ცელულაზები. ეს იქიდან ჩანს რომ 1-ლ და მე-2 შემთხვევებში, როცა კულტურა იზრდებოდა ქსილოზის გარეშე, ცილის რაოდენობა უფრო ნაკლები იყო, ვიდრე მე-3 და მე-4 შემთხვევებში (ემატებოდა ქსილოზა). ეს შედეგი მოულოდნელია, იმიტომ რომ ქსილოზა ჰემიცელულაზების ჰიდროლიზს საბოლოო პროდუქტი, ხუთ ნახშირბადატომიანი შაქარია და საერთო არაფერი აქვს ცელულაზების სუბსტრატთან. ერთადერთი შესაძლო ახსნა იმაში უნდა მდგომარეობდეს, რომ ცელულაზების და ჰემიცელულაზების გენები, მიკროორგანიზმების გენომში, ახლო-ახლო არიან ერთმანეთთან განლაგებულნი და ალბათ ქსილოზას მოქმედების ეფექტი ორივეს ეხება (139).

ხშირად მიცელალურ სოკოებს მცენარეული მასალის დაშლის და შეთვისების უნარის მიხედვით ცხოველების საკვებში ცილის მისაღებადაც იყენებენ (140). მონაცემები თერმოფილებზე, და მითუმეტეს ექსტრემალურ თერმოფილებზე-სოკოებზე, ძალზედ მცირეა. ამიტომ ჩვენ შევეცადეთ

ეროვნული ბიბლიოთეკა

შეგვედარებინა ჩვენს მიერ შერჩეული კულტურა A.terrestris-ი რომელიმე ცნობილი კულტურისადმი ბუნებრივი სუბსტრატის დაშლის მიხედვით.

ამ მიზნისათვის ავირჩიეთ კარგად ცნობილი კლასიკური მეზოფილი A.bisporus, რომელიც მიცელარულ სოკოების სულ სხვა ჯიშს ეკუთვნის. უნდა აღინიშნოს, რომ A.Bisporus-თვის ყველაზე კარგ სუბსტრატად ითვლება ნამჯა და როგორც ლიტერატურაშია ცნობილი (141) ნამჯა ხშირ შემთხვევაში წარმოადგენს სხვადასხვა კარბოჰიდრაზების ბიოსინთეზის ინდუქტორს.

ამ კულტურის მიერ სინთეზირებული ციტლებიდან ჩვენ პრეპარატიული ელექტროფორეზის საშუალებით გამოვყავით 4 ტიპის ენდოგლუკანაზა (სურ.18), რომლებიც შევადარეთ ანალიტიკური იზოელექტროფოკუსირებით (სურ.19,20) და გელში გავზომეთ აქტივობა ზიმოგრამულად. განსაზღვრული იქნა მათი სხვადასხვა აქტივობებიი (ცხრილი 13,14).

როგორც ცხრილი 13,14-დან ჩანს ორგანიზმ A.terrestris-თვისაც ნამჯის გამოყენება ნახშირბადის წყაროდ დაახლოებით ორჯერ ზრდის უკრედგარეშე ენდოგლუკანაზურ და ქსილანაზურ აქტივობებს.

აღნიშნული მონაცემები მით უფრო საინტერესოა, რომ კულტურა A.terrrestris-სი ნამჯაზე ზრდის დროს მიცელიუმს პრაქტიკულად არ აგროვებს კულტურალურ სითხეში, იგი უმეტესად იზრდება ნამჯის შიგნით ნაწილში (სურ 21).

ელექტრონულ-მიკროსკოპულმა ანალიზმა ნათელყო, რომ კულტურა A.terrestris იზრდება ნამჯის შიგნით, ხოლო შემდგომ მის ზედაპირსაც ედება (სურ.22,23,24,25,26,27,28).

ზრდის სულ სხვა მექანიზმებით ხასიათდებოდა კულტურა A.bisporus. იგი იზრდებოდა ჯერ ზედაპირზე და მხოლოდ სუბსტრატის სტრუქტურის ნაწილობრივი დაშლის შემდეგ ახერხებს ნამჯის შუაგულში შეღწევას სურ. 29.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

სკანირებადი მიკროსკოპის საშუალებით შესაძლო გახდა დაგვენახა A.terrestris-ის ნამჯის ზედაპირზე ადსორბირება სურ. 30, 31. სურ. 32, 33, 34-ზე წარმოდგენილია ამავე ორგანიზმის მიერ დაშლილი და დაუშლელი ნამჯის ნაწილების შედარება.

ცხრილი №12

კულტურა A.terrestris-ის უჯრედგარე აქტივობები, ნახშირბადის სხვადასხვა წყაროზე 48° პირობებში კულტივირებისას.

№	ნახშირბადის წყარო	ცილა	ენდოგლუკანაზური აქტიობა		ქსილანაზური აქტიობა	
		მგ\მლ	nkat/ml	nkat/mg	nkat/ml	nkat/mg
1	მკც	0,075	0,023	3,07	0,27	3,62
2	მკც+ქსილოზა	0,064	0,19	2,96	0,27	4,21
3	ქსილოზა	0,1	0,2	2,0	0,42	4,24
4	მკც+ქსილოზა 48 სთ-ის შემდეგ	0,064	0,3	4,68	0,71	11,09

ნახშირბადის წყარო:

1) მკც 2) მკც+ქსილოზა 3) ქსილოზა

4) მკც+ქსილოზა 48 საათიანი კულტივირების შემდგომ

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ცხრილი №13

A.terrestris-ის და A.bisporus-ის ენდოგლუკანაზური აქტივობები ნამჯაზე და მიკროკრისტალურ ცელულოზაზე კულტივირებისას.

შტამი	ნახშირბადის წყარო	ცილის კონცენტრ.	ენდოგლუკანაზური აქტივობა	
		მგ/მლ	nKat/ml	nKat/mg
A.terrestris	მკც	0,023	0,12	5,43
A.terrestris	ნამჯა	0,045	0,48	10,0
A.bisporus	მკც	0,013	0,11	0,45
A.bisporus	ნამჯა	0,015	0,11	0,46

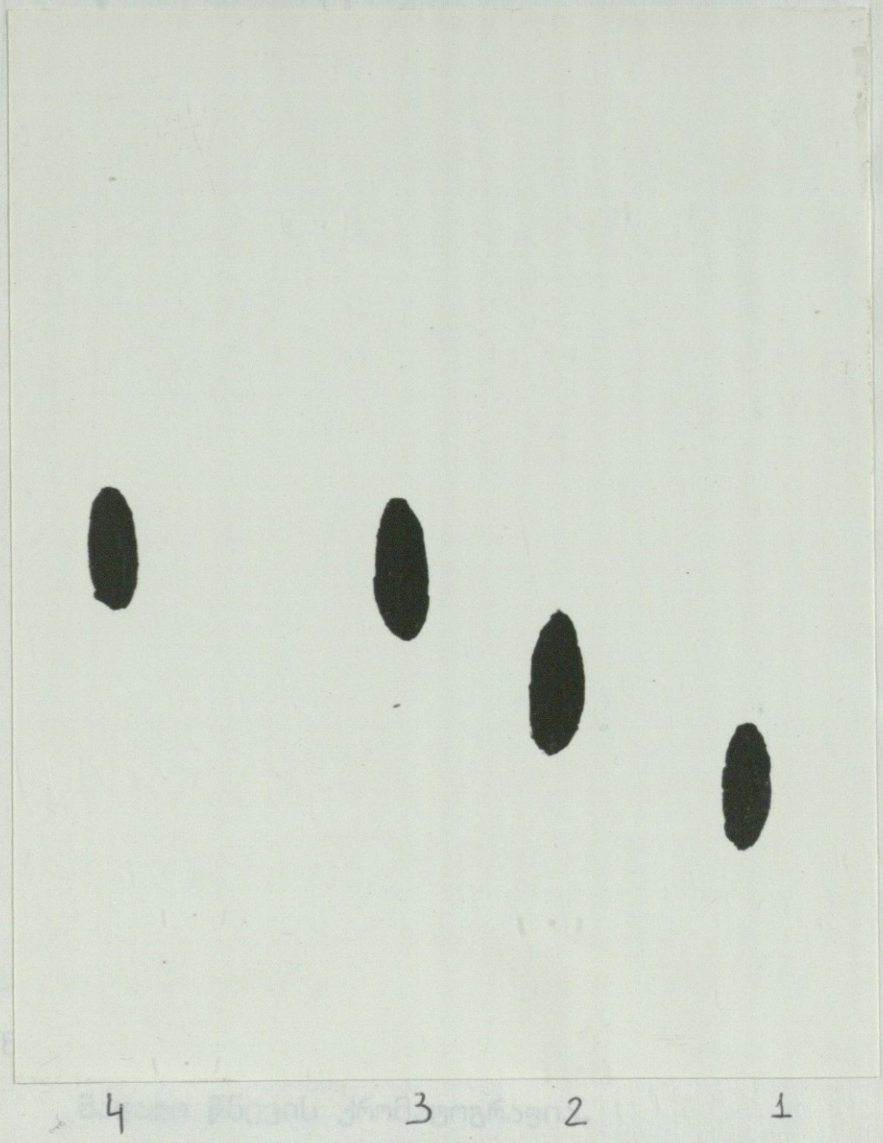
კულტივირების პირობები: A.terrestris-48°, A.bisporus-25°

ცხრილი №14

A.terrestris-ის უჯრედგარეშე ქსილანაზური აქტივობები ნამჯაზე და მიკროკრისტალურ ცელულოზაზე კულტივირებისას 48°-იან ტემპერატურულ რეჟიმში.

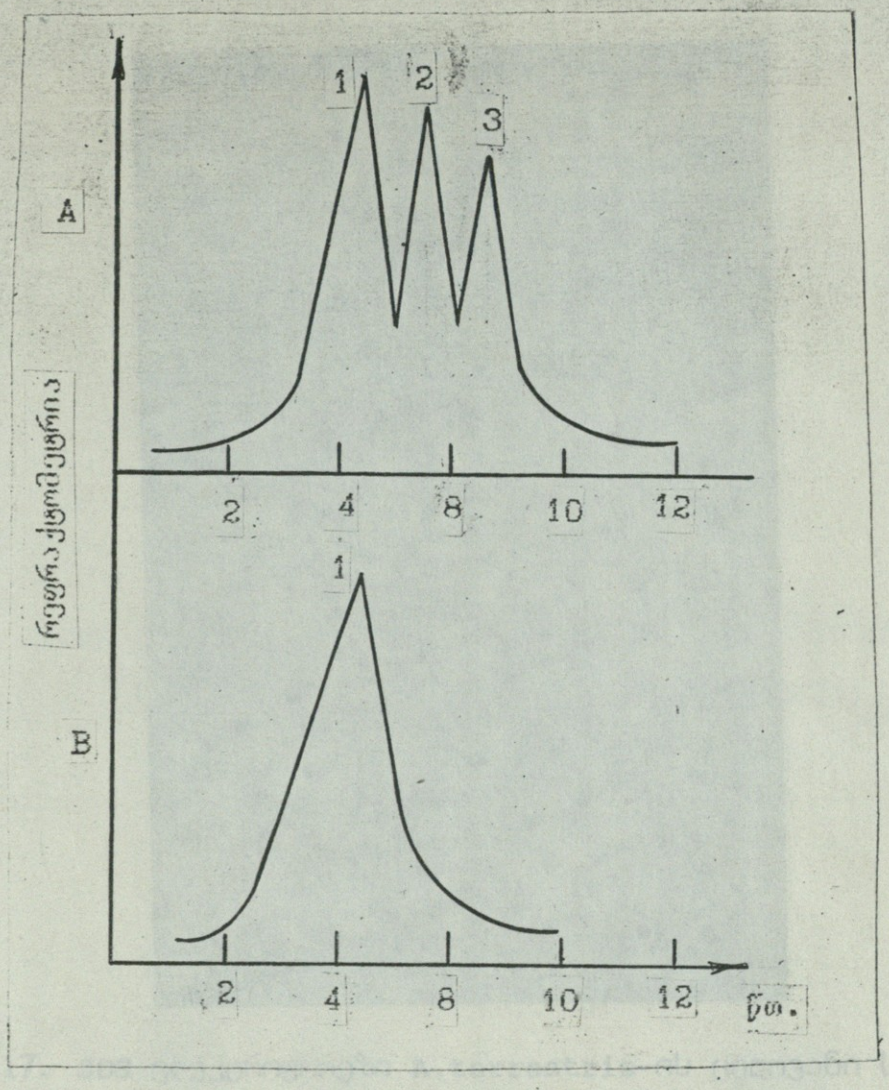
ნახშირბადის წყარო	ცილის კონცენტრაცია	ქსილანაზური აქტივობა	
	მგ/მლ	nKat/ml	nKat/mg
მკც	0,023	8,3	360
ნამჯა	0,045	24	530

ეროვნული ბიბლიოთეკა



სურ. 15. A.terrestris-ის 96 საათიანი კულტურალური ფილტრაცის თხელშრიანი ქრომატოგრამა. 1.-ცელოტრიოზა 2.-ცელობიოზა 3.-გლუკოზა 4.-A.terrestris-ის კულტურალური სითხე. გაზრდილი 48°-ზე, მკც-ზე.

ეროვნული ბიბლიოთეკა



სურ. 16. A.terrestris-ის 96 საათიანი კულტურალური ფილტრატის მაღალი წნევის ქრომატოგრაფია.

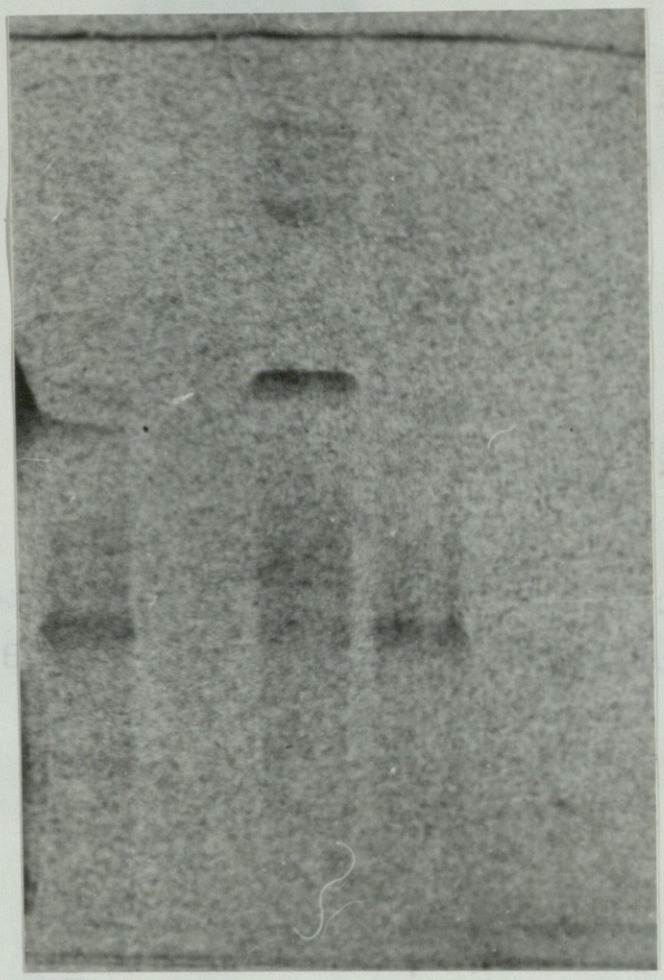
A. 1)-მოწმე-გლუკოზა

2)-მოწმე-ცელობიოზა

3)-მოწმე-ცელოტრიოზა

B. 4)-A.terrestris-ის კულტურალური სითხე. გაზრდილი მკც-ზე, 48°-ზე.

ეროვნული ბიბლიოთეკა



სურ. 17. SDS-ელექტროფორეზი A.terrestris-ის ცილოვანი სპექტრი 48° ტემპერატურულ რეჟიმში სხვადასხვა ნახშირბადის წყაროებზე კულტივირებისას.

1)-მკც-ზე გაზრდილი A.terrestris + ქსილოზა 48 საათიანი კულტივირების შემდგომ.

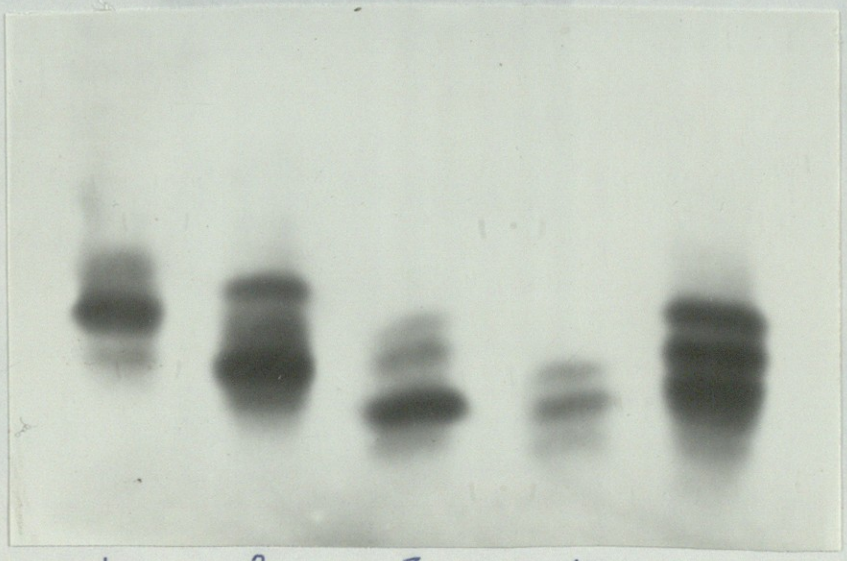
2)-მკც-ზე გაზრდილი A.terrestris.

3)-მკც+ქსილოზა-ზე გაზრდილი A.terrestris.

4)-ქსილოზაზე გაზრდილი A.terrestris-სი.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

სურ. 18. კულტურა A.bisporus-ის მიერ სინთეზირებული ენდოგლუკანაზები ნატიური გელ ელექტროფორეზის ზიმოგრამა (გელში განსაზღვრული აქტივობა).



სურ. 19 A.bisporus-ის ენდოგლუკანაზების ანალიტიკური იზოელექტროფოკუსირება. ფრაქციების ნუმერაცია შეესაბამება მათ ელექტროფორეტიკულ ძვრადობას:

1) ყველაზე მეტად წანაცვლებული ფრაქცია გელ ელექტროფორეზში (სურ. 18).

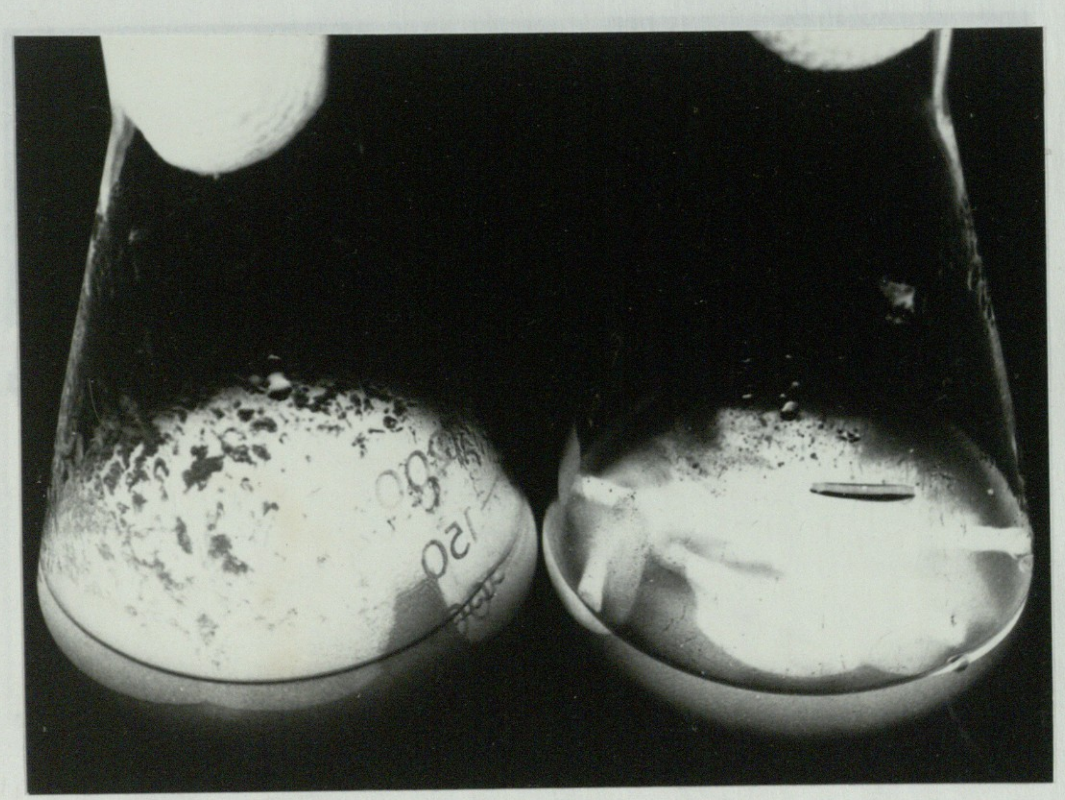
2) 1-ის მომდევნო ფრაქცია 3) 2-ის მომდევნო ფრაქცია

4) 3-ის მომდევნო ფრაქცია

ეროვნული ბიბლიოთეკა

სურ. 20. მე-19 სურათზე წარმოდგენილი ნიმუშების ანალიტიკური იზოფოკუსირების ზიმოგრამული აქტივობა.

ეროვნული ბიბლიოთეკა



2 1

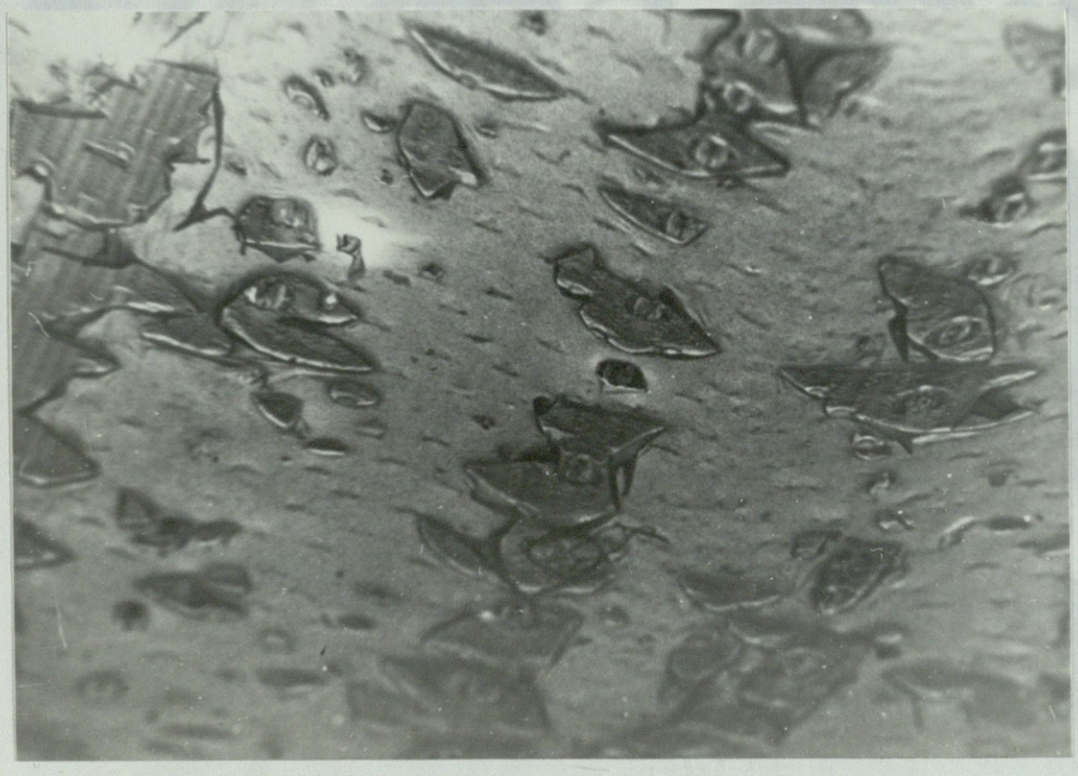
სურ.21. კულტურა A.terrestris-ი გაზრდილი ნამჯაზე და მკც-ზე.

1.-ნამჯა, 2.-მკც

ეროვნული ბიბლიოთეკა

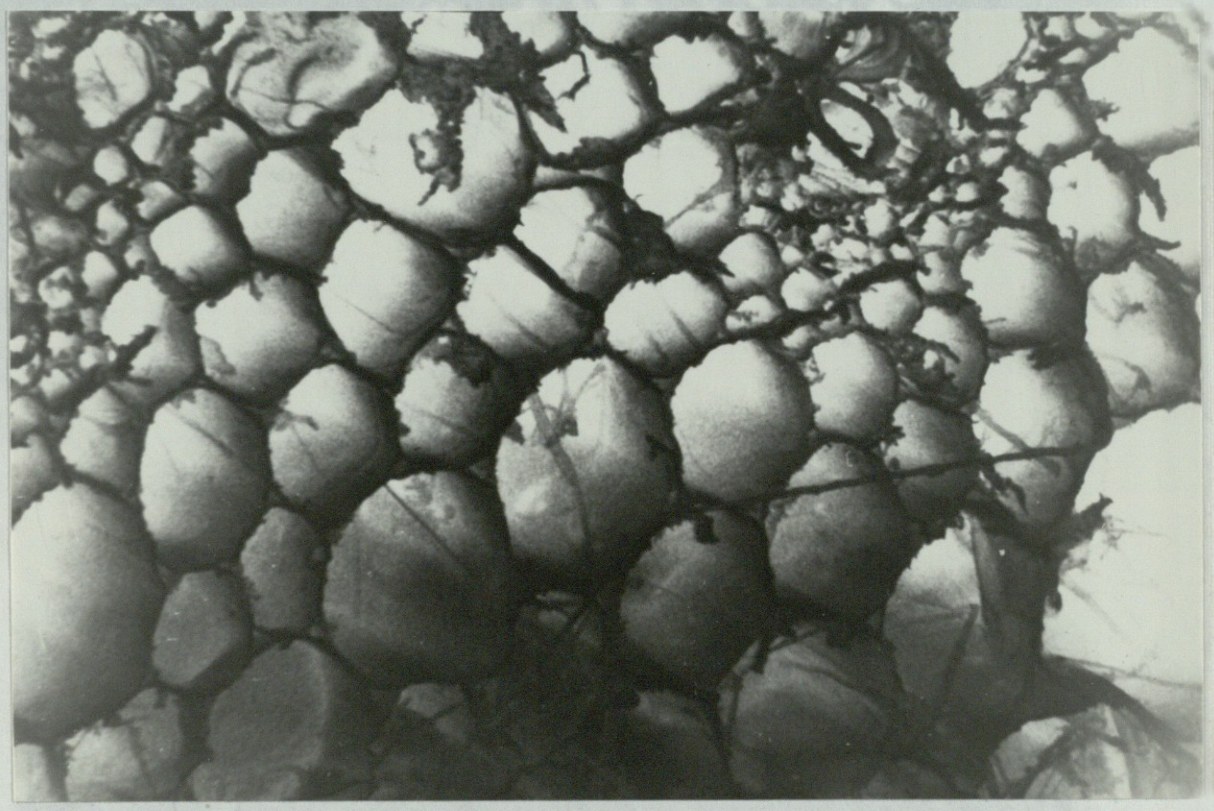
სურ.22. სკანური მიკროსკოპია კულტურა A.terrestris-ის გაზრდილი ნამჯაზე. A) ნამჯის შიგნითა მხარე. B) ნამჯის ზედაპირი.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

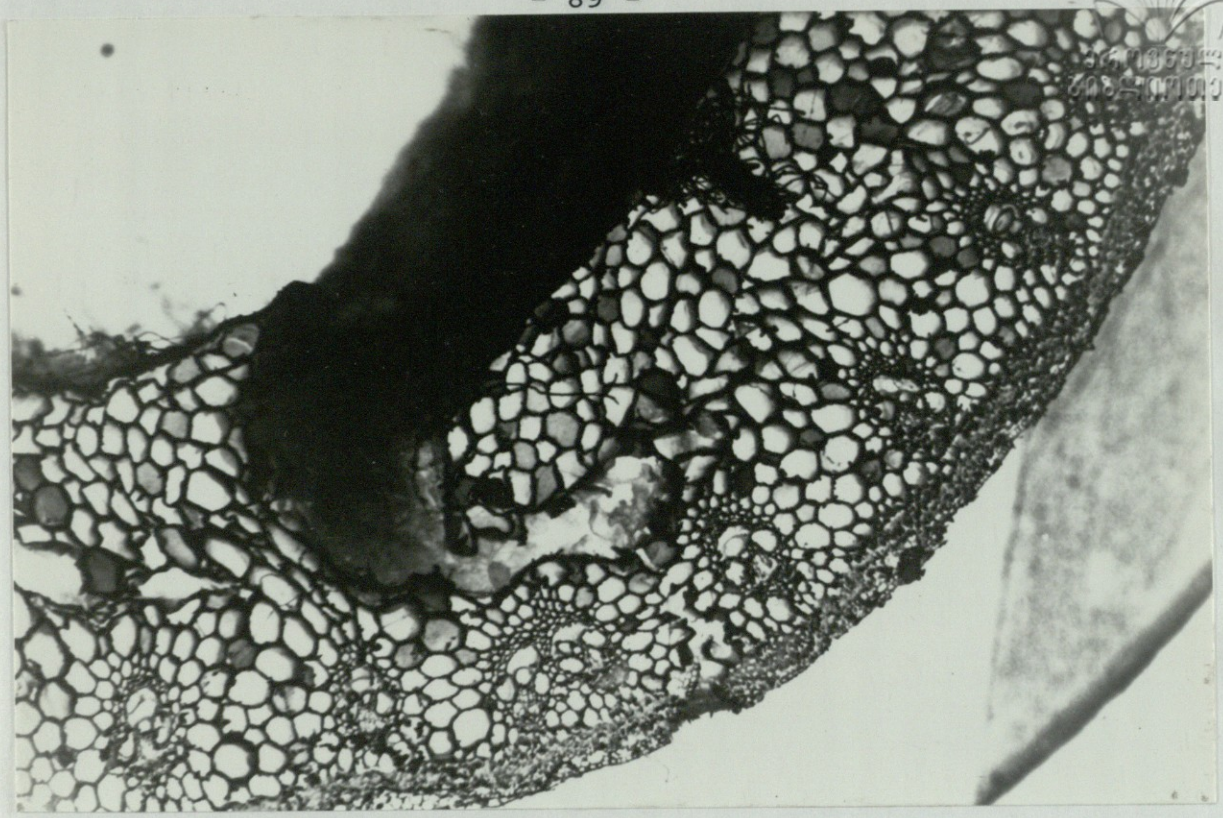


სურ.23. ნამჯის ზედაპირი. A.terrestris.

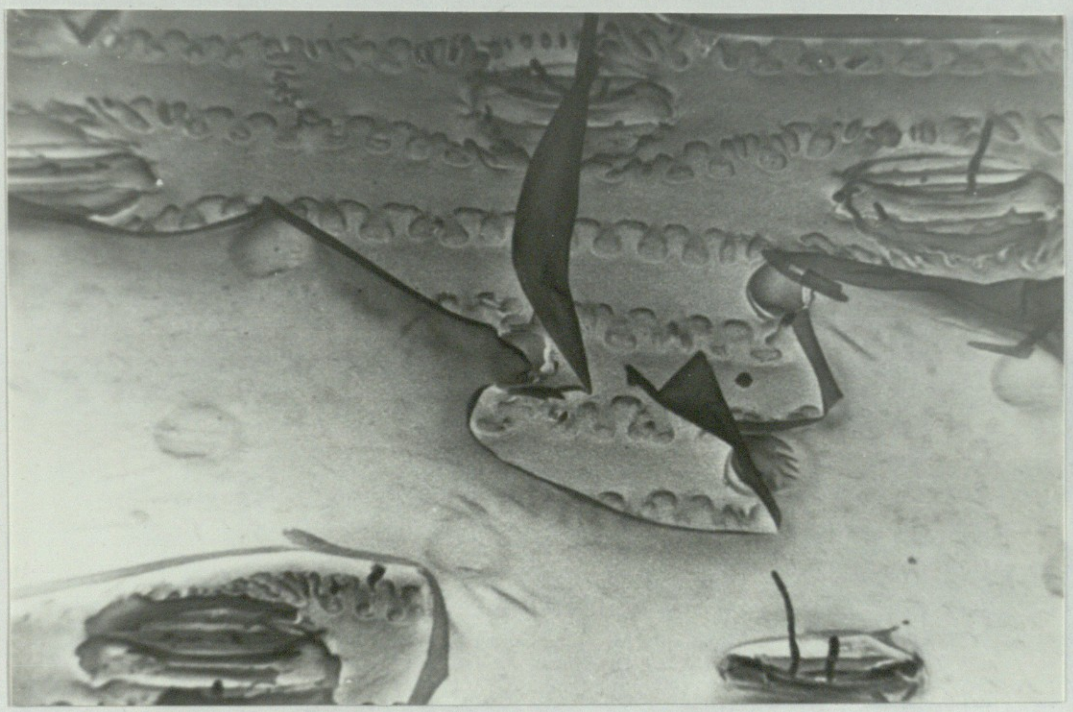
ეროვნული ბიბლიოთეკა



სურ.24. ნამჯის გვერდითი მხარე. A.terrestris.

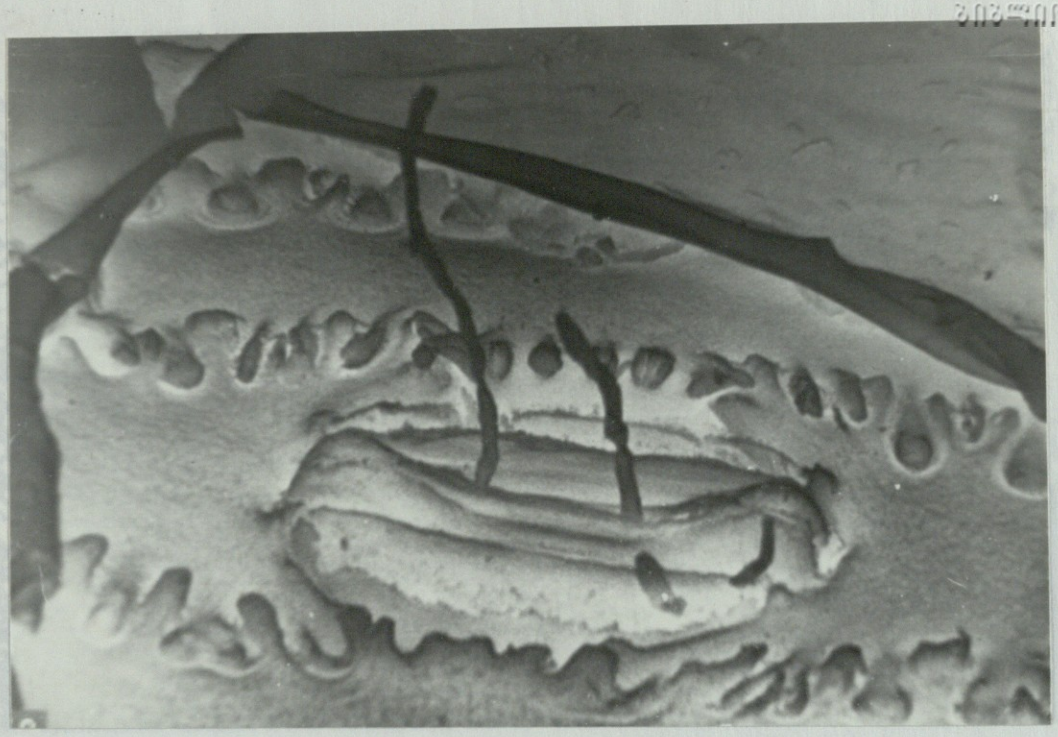


სურ.25. ნამჯის შუაგული. A.terrestris.



სურ.26. ნამჯის ზედაპირზე ამოსული A.terrestris-ის ჰიფები.

ეროვნული ბიბლიოთეკა



სურ.27. ნამჯის ზედაპირზე ამოსული A.terrestris-ის ჰიფი.

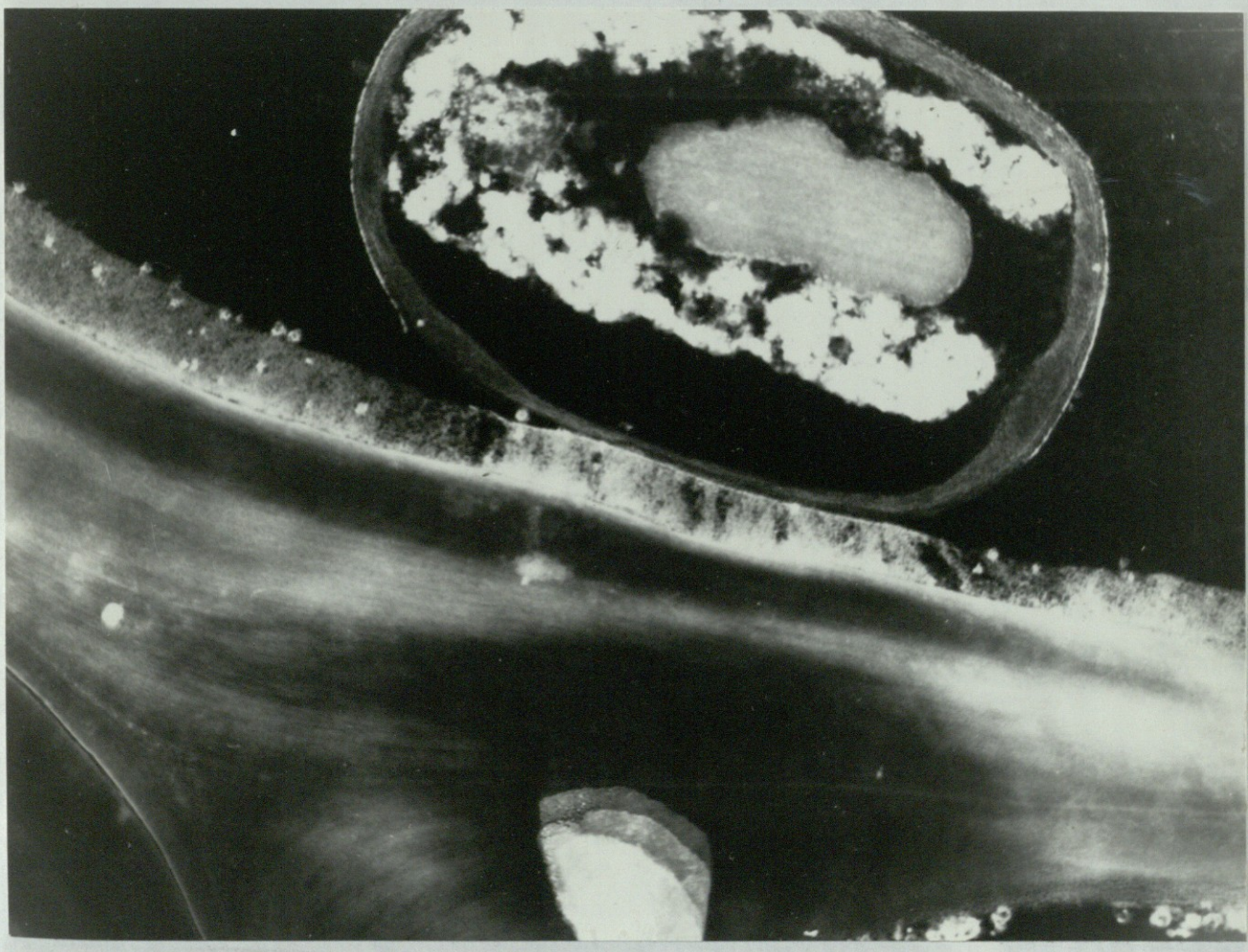
სურ.28. ნამჯის ზედაპირზე ამოსული A.terrestris-ის ჰიფი.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

სურ.29. A.bisporus-ის ჰიფები ნამჯის ზედაპირზე.

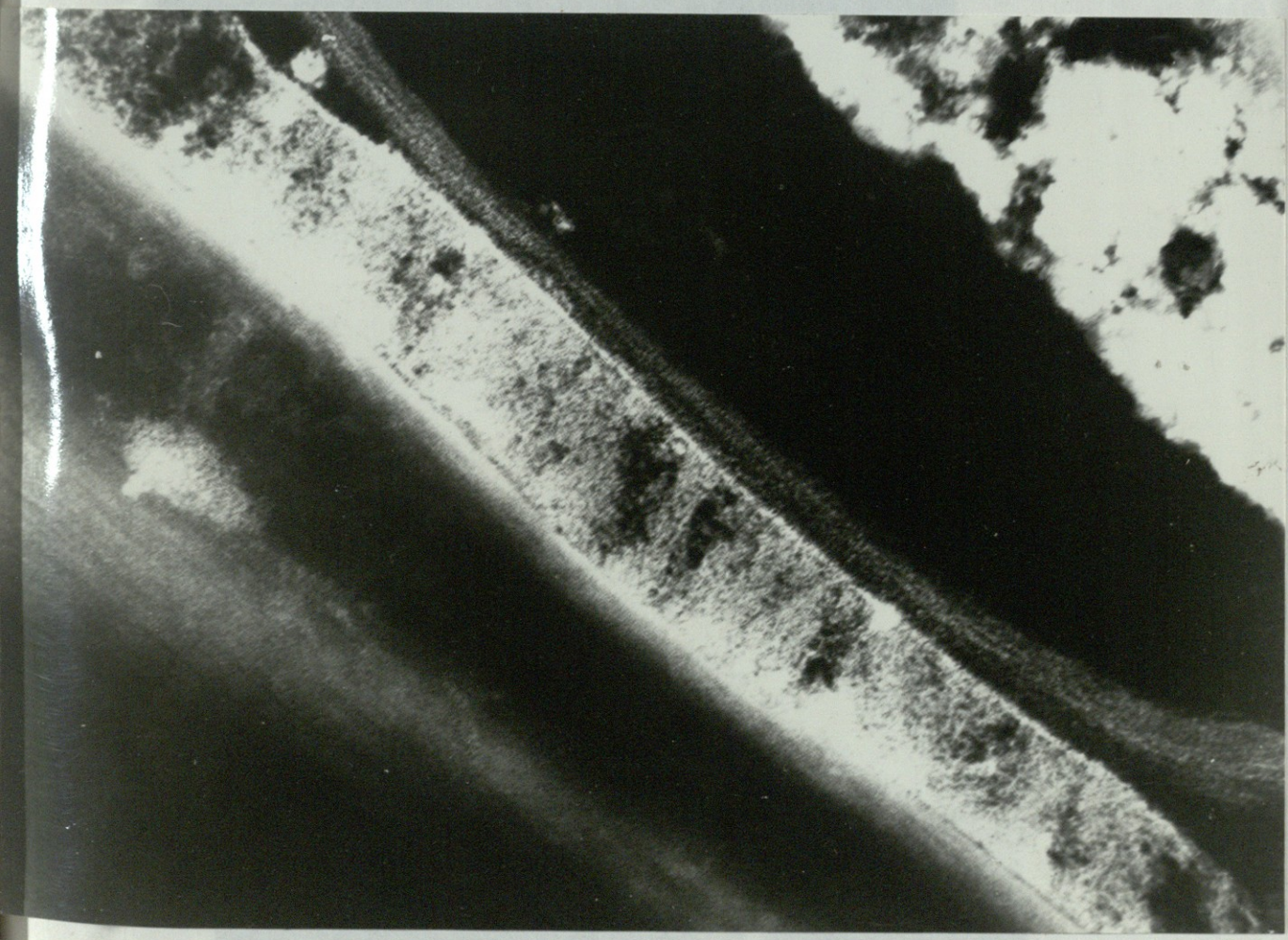
სურ.30. ნამჯის ზედაპირზე ადსორბირებული A.terrestris-ის ბიომასის ელექტრონული მიკროსკოპია.

ეროვნული ბიბლიოთეკა



სურ.31. A.terrestris-ის უჯრედისა და ნამჯის ზედაპირი.

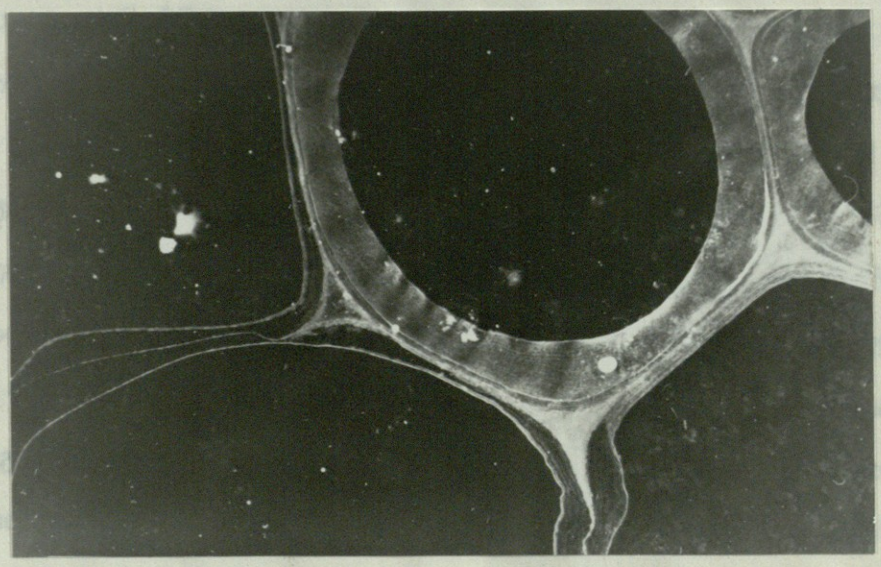
ეროვნული ბიბლიოთეკა



სურ.32. A.terrestris-ის აღსორბიებული უბანი ნამჯაზე

ეროვნული ბიბლიოთეკა

სურ. 33. ნაწილობრივ დაშლილი ნამჯა.



სურ. 34. დაშლილი ნამჯა.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

3.3. A. terrestris-დან თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის გამოყოფა და მისი დახასიათება

თერმოფილური სოკო Allesheria terrestris-დან თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის გამოყოფის პირველ ეტაპად შევარჩიეთ აფინური ქრომატოგრაფია, ე.წ. „Batch" მეთოდი. ფერმენტულ პრეპარატს, ცილის კონცენტრაციით 0,74-0,90 მგ/მლ, რომელიც წინასწარ იყო დამუშავებული 65°-ზე 1,5 სთ-ის განმავლობაში, 0.05M Na-აცეტატურ ბუფერში pH 4,5, ვაშორებდით ნალექს და სუპერნატანტს ვუმატებდით პოლიეთილენის ჭიქაში ჩაყრილ 482 მგ მიკროკრისტალურ ცელულოზას და ცილის ადსორბირებისათვის ვტოვებდით 18სთ-ის განმავლობაში, 4° ტემპერატურაზე. ფერმენტული ხსნარის საწყისი ხვედრითი აქტივობა შეადგენდა 14,5 nKat/mg-ს; ცილების დესორბციას ვახდენდით ჯერ 0,1M-ის pH 4,5 Na-აცეტატური ბუფერით, შემდეგ 0,1M-ის pH 7,4 Na-ფოსფატური ბუფერით. ჩვენთვის საინტერესო აღმოჩნდა წყლით დესორბციისას მიღებული ფრაქცია. ენდოგლუკანაზის ხვედრითი აქტივობა შეადგენდა 244 nKat/mg. ამ ფრაქციას ვაკონცენტრირებდით ულტრაფილტრაციით და შემდგომ ვახდენდით მის იდენტიფიცირებას 12%-იანი SDS-გელ ელექტროფორეზით (სურ.35).

გაწმენდის შემდეგ ეტაპს წარმოადგენდა იონცვლადი ქრომატოგრაფია. მატარებლად გამოვიყენეთ DEAE Toyopearl-ი 650M, სვეტი რომლის ზომებიც იყო: d=1,5სმ, h=12სმ. ელუციას ვაწარმოებდით 0,06M-ის, Na-ფოსფატური ბუფერით გრადიენტით pH 7,6, 0-0,2M-მდე და შემდგომ საფეხუროვანი გრადიენტით 1M NaCl-მდე (სურ.36). ამ საფეხურის შემდეგ ენდოგლუკანაზის ხვედრითი აქტივობა გაიზარდა 500nKat/mg-მდე. შემდეგ ვახდენდით ენდოგლუკანაზური ფრაქციის კონცენტრირებას და ფერმენტის იდენტიფიცირება 12%-იანი SDS-გელ-ელექტროფორეზით (სურ.37). ამგვარად შევძელით მიგვეღო ექსტრემალური თერმოფილის A.terrestris-ის

ეროვნული ბიბლიოთეკა

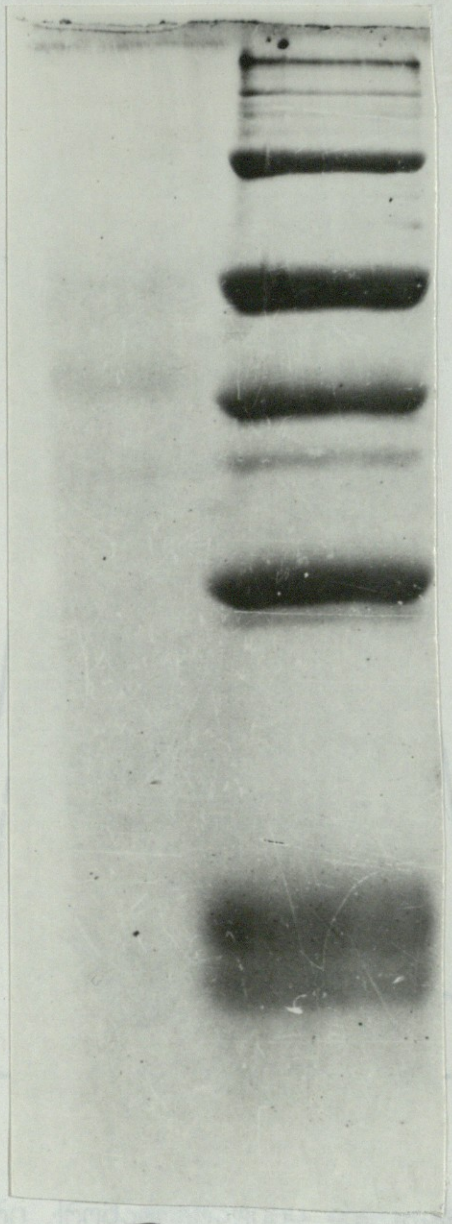
ენდოგლუკანაზა ელექტროფორეტიკულად ჰომოგენურ მდგომარეობაში.

ჰომოგენურ ფერმენტზე შევისწავლეთ მისი ზოგიერთი მახასიათებლები. პირველ რიგში შემოწმებული იქნა მისი თერმომედეგობა. ჰომოგენური ფერმენტის ინკუბირებას ვახდენდით 65° ტემპერატურაზე სუბსტრატის გარეშე და დროის გარკვეული ინტერვალების შემდეგ ვზომავდით ენდოგლუკანაზურ აქტივობას. თერმოინაქტივაციამ, სუბსტრატის გარეშე (სურ.38), გვიჩვენა, რომ 6 საათის ინკუბაციის შედეგად აღნიშნულ პირობებში ჰომოგენური ენდოგლუკანაზა კარგავდა საწყისი აქტივობის დაახლოებით 20%-ს.

SDS-გელ-ელექტროფორეზის საშუალებით (სურ.37), დავადგინეთ, რომ Allesheria terrestris-დან გამოყოფილი თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის მოლეკულური მასა შეადგენდა 69 000, ხოლო იზოელექტროფოკუსირების საშუალებით, დადგენილი იქნა იზოელექტრული წერტილი, რომელიც ტოლი აღმოჩნდა pI=6,4.

მიხაელის-მენტენის მუდმივა, როგორც 39-ე სურათიდან ჩანს რომელიც გამოსახულია ლაინუივერ-ბერკის კოორდინატებში (1/V, 1/[S]), ტოლია K_m=6,6 გ/ლ.

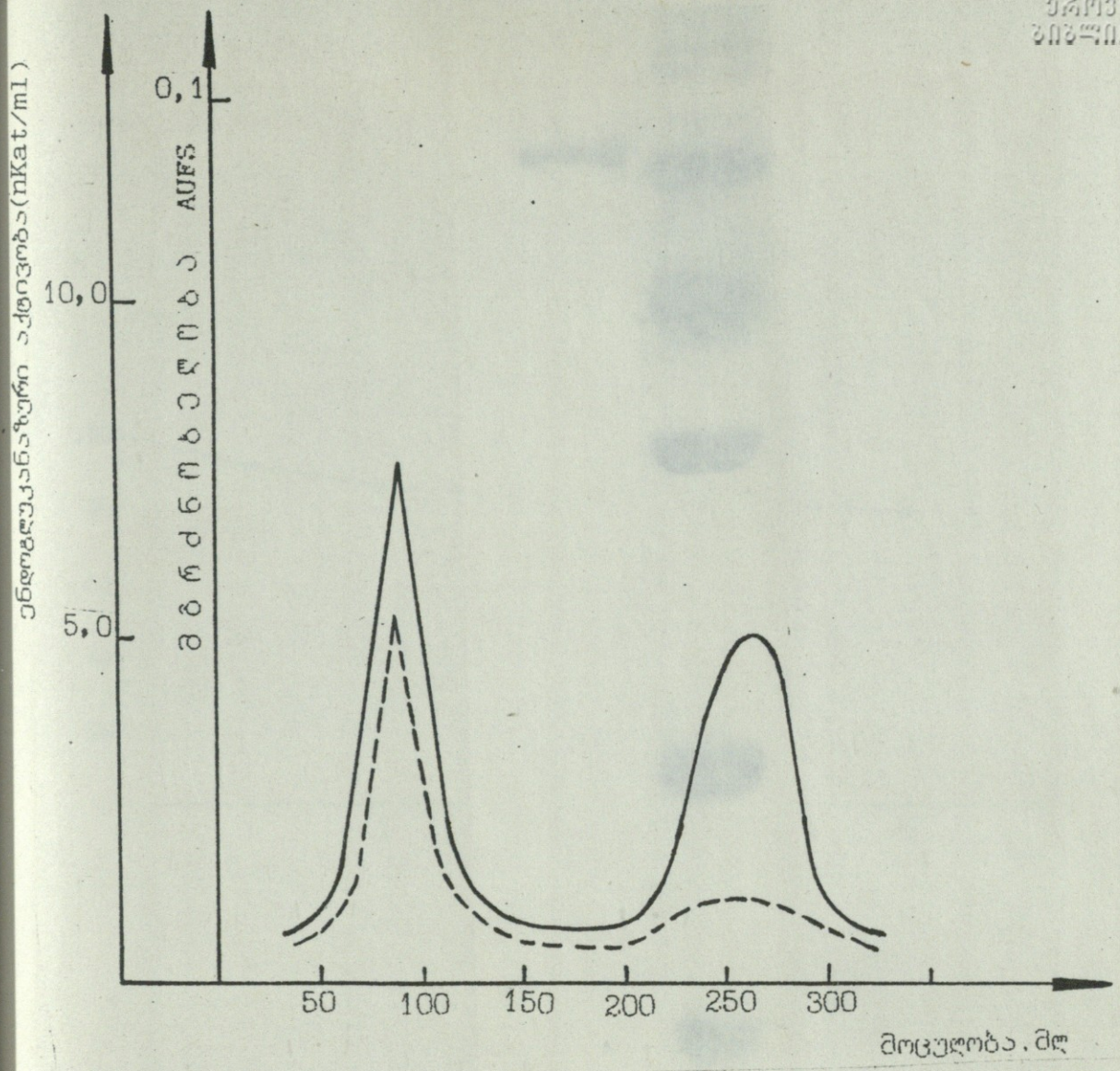
გაწმენდილ ენდოგლუკანაზას გააჩნდა დომენური ჰომოლოგია მეზოფილური კულტურა T.reesei-დან გამოყოფილ ენდოგლუკანაზის მიმართ მიღებულ პოლიკლონალურ ანტისხეულებთან, თუმცა გაწმენდილი თერმომედეგი კომპონენტი არ წარმოადგენდა ერთადერთ ცილას კულტურა A.terrestris-დან, რომელიც ავლენდა ჰომოლოგიის აღნიშნულ ეფექტს (სურ.40).



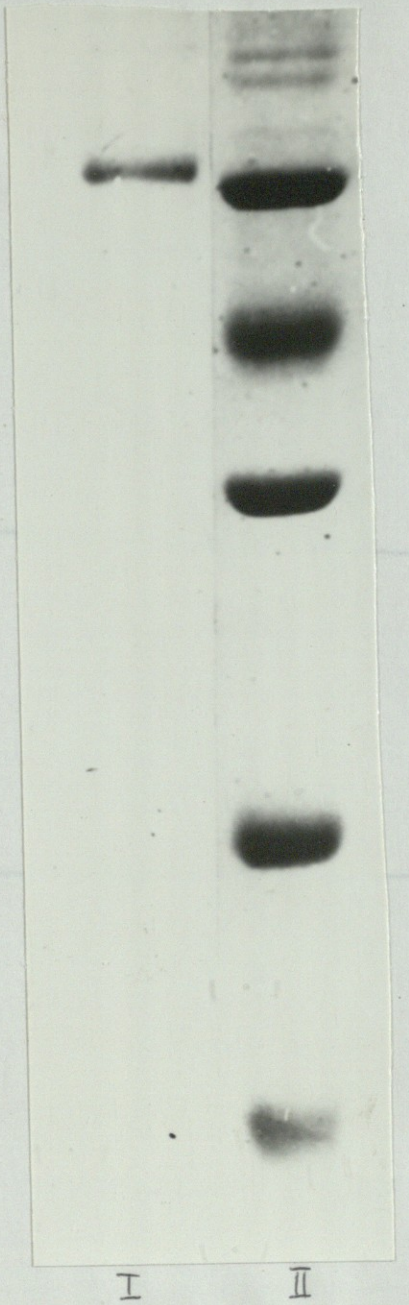
სურ. 35 12%-იანი SDS-გელ ელექტროფორეზი

I-მოწმეები: 94 000, 67 000, 40 000, 32 000, 18 000, 15 000.

II-აფინური ქრომატოგრაფიის შედეგად წყლით დესორბციისას მიღებული ფრაქცია.



სურ. 36 აფინური ქრომატოგრაფიის შედეგად მიღებული აქტიური ფრაქციის იონცვლადი ქრომატოგრაფია. მატარებელი DEAE Toyopearl 650M-ი. ცდის პირობები: სვეტის ზომები 1,5*12სმ, ელუცია მიმდინარეობდა 0,06M-ის pH7,6 Na-ფოსფატური ბუფერით გრადიენტით 0-0,2M-მდე და შემდეგ 1M NaCl-ით.



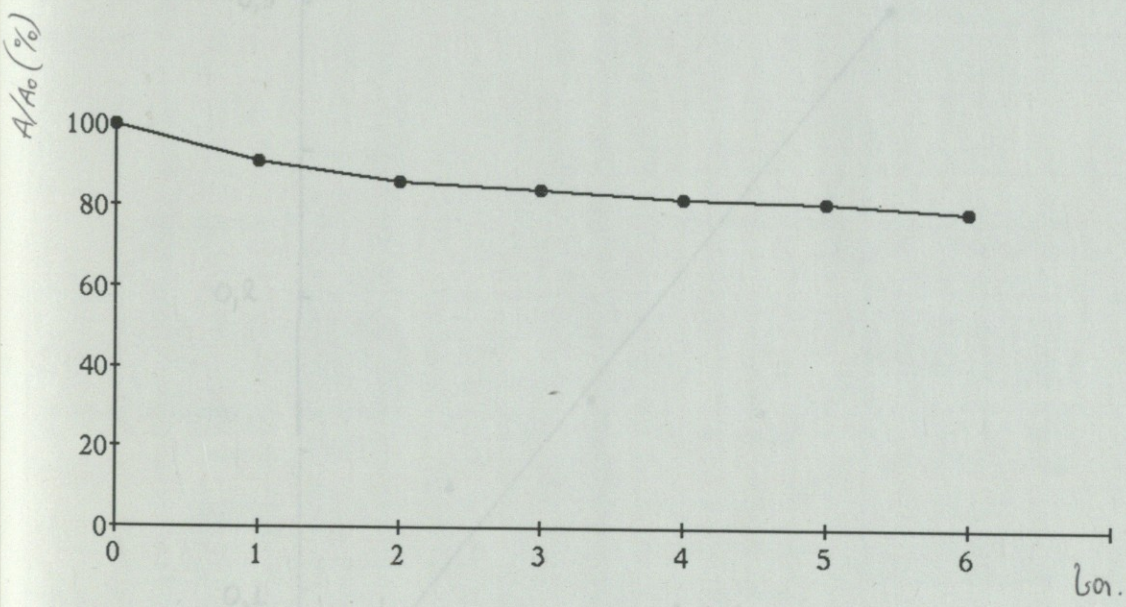
სურ. 37 12%-იანი SDS-გელ ელექტროფორეზი.

I-თერმოფილური სოკო Allesheria terrestris-დან

გამოყოფილი თერმომედეგი ენდოგლუკანაზა

II-მოწმეები: 1-94 000, 2-67 000, 3-43 000,

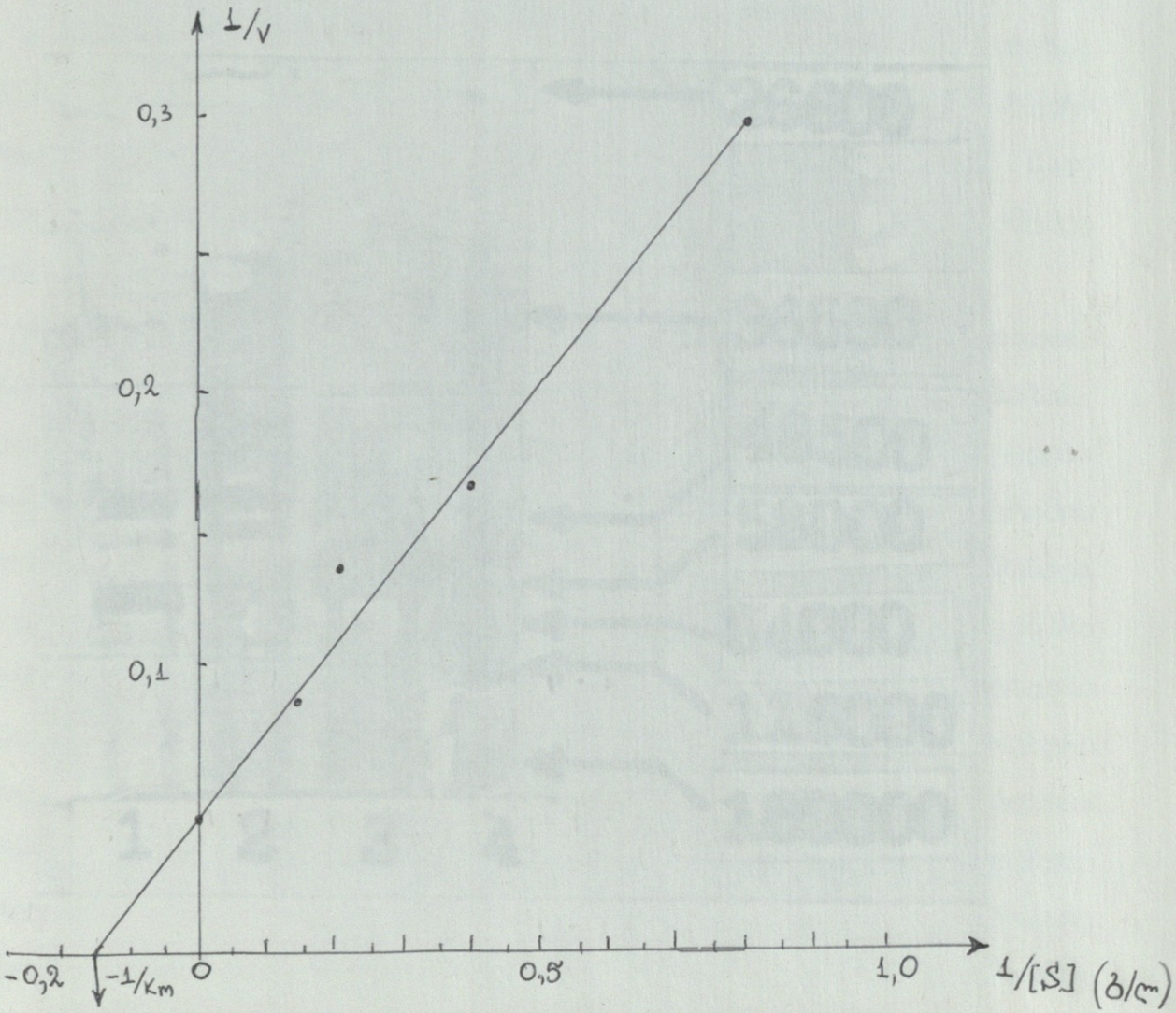
4-30 000, 5-20 000.



სურ. 38 თერმოფილური სოკო A.terrestris-დან გამოყოფილი ენდო-1,4-β-გლუკანაზის თერმოინაქტივაცია 65°-ზე სუბსტრატის გარეშე.

ცდის პირობები: ფერმენტული ხსნარის ინკუბაცია მიმდინარეობდა 0,05M-ის Na-აცეტატურ ბუფერში, pH 4,5, 65° ტემპერატურაზე, სუბსტრატის გარეშე.

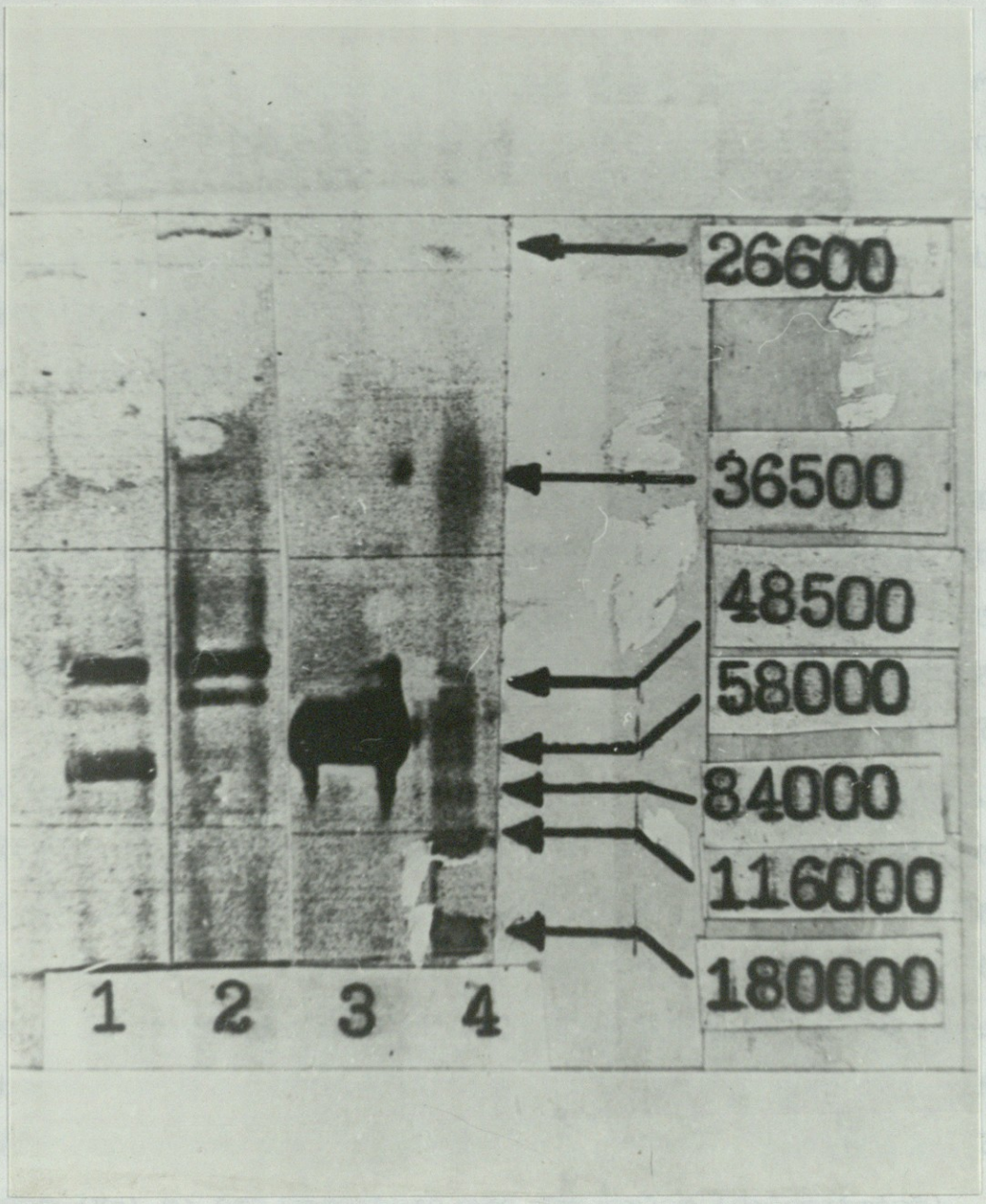
ეროვნული ბიბლიოთეკა



სურ. 39 A. terrestris-ის თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის მიხაელის-მენტენის მუდმივას დადგენა

ცდის პირობები: 0,05M-ის აცეტატური ბუფერი, pH 4,5, ინკუბაციის ტემპერატურა 50°, სუბსტრატის კონცენტრაციები: 10გ/ლ, 5გ/ლ, 2,5გ/ლ, 1,25გ/ლ.

ეროვნული ბიბლიოთეკა



სურ. 40 იმუნობლოტინგი: Trichoderma reesei-ის ენდოგლუკანაზა I-ის მიმართ მიღებული ანტისხეულების იმუნოჯვარედული რეაქცია A. terrestris-ის ცილებთან. 1-48° ტემპერატურაზე გაზრდილი A. terrestris-ის კულტურალური სითხის ფილტრატი, 2-40° გაზრდილი A. terrestris-ის კულტურალური სითხის ფილტრატი, 3-T. reesei-დან გამოყოფილი ძირითადი ენდოგლუკანაზა, 4-წინასწარ შეღებილი ცნობილი მოლეკულური მასის მქონე მოწმეები.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

დახასიათებული ენდოგლუკანაზა ძაღზედ საინტერესო ფერმენტს წარმოადგენს მისი თერმომედეგობის თვალსაზრისით. მიუხედავად იმისა, რომ T.Reesei-დან გამოყოფილი იყო ნაკლებად მედეგი ენდოგლუკანაზა, ჩვენ ჩავთვალეთ საჭიროდ სრული სურათის მისაღებად მიგვეღო კლასიკური მეზოფილიდან სხვა ტიპის ენდოგლუკანაზები და შეგვედარებინა მათი ფიზიკო-ქიმიური თვისებები აღნიშნული კულტურიდან გამოყოფილ თერმომედეგ ენდოგლუკანაზასთან

ამ მიზნისათვის ჩვენ შევარჩიეთ მეზოფილური კულტურა A.bisporus, რომელიც,როგორც ცნობილია ასინთეზირებს ოთხი ტიპის ენდოგლუკანაზას. პრეპარატული ელექტროფორეზით ოთხივე ენდოგლუკანაზური აქტივობა შორდებოდა ერთმანეთს, რაც ნათლად ჩანდა ამ ელექტროფოროგრამის ზიმოგრამულ აქტივობაზე ნახ.41. აღნიშნული ზონების ამოჭრის შემდეგ ჩავატარეთ გელიდან ექსტრაქცია და მივიღეთ ოთხი ტიპის ენდოგლუკანაზა რომლებიც იდენტიფიცირებულნი იყვნენ ანალიტიკური იზოელექტროფოკუსირებით ნახ. 42, 43. ამგვარად მიღებული ჰომოგენური ენდოგლუკანაზები დავახასიათეთ ზოგიერთი ფიზიკო-ქიმიური მაჩვენებლებით ცხრილი 13. როგორც ამ ცხრილის მონაცემებიდან ჩანს, მიღებული ენდოგლუკანაზები მნიშვნელოვნად განსხვავდებოდნენ როგორც თერმომედეგობით ასევე ხვედრითი აქტივობით, სუბსტრატის მიმართ სწრაფვით (Km) და ელექტროფორეტიკული ძვრადობით (მობილურობით).

ცხრილში ენდოგლუკანაზები მოყვანილია მათი ელექტროფორეტიკული ძვრადობის მიხედვით. როგორც ჩანს ოთხივე ფრაქცია განსხვავდება ერთმანეთისგან ამა თუ იმ მაჩვენებლით.

ამგვარად, ჩვენს მიერ გამოყოფილი და გასუფთავებულია 7 სხვა-დასხვა წარმოშობის ენდოგლუკანაზა. ყველა აღნიშნული ფერმენტი გამოვყავით თერმოფილური ან მეზოფილური სოკოებიდან. ცხრილ №16-ში

ეროვნული ბიბლიოთეკა

მოყვანილია ყველა გამოყოფილი ენდოგლუკანაზების ძირითადი მახასიათებელი, რომლებიც ჩვენის აზრით წარმოდგენას იძლევიან მათ ძირითად მოლეკულურ თვისებებზე. აღნიშნულ ცხრილში მოყვანილი მონაცემები კიდევ ერთხელ მიუთითებენ იმაზე, რომ მნიშვნელოვანი განსხვავება წარმოდგენილ ფერმენტების თვისებებს შორის, აღინიშნება მხოლოდ თერმომედეგობაში.

ცხრილი №15

A.bisporus-ის ენდოგლუკანაზების კინეტიკური მახასიათებლები

		$\tau_{1/2}$	Km
	აქტივობა	ნახევრად ინაქტივაციის დრო	მიქაელისი კონსტანტა
	nKat/mg	წთ.	გრ/ლ
1	38,75	8	0,15
2	52,50	18	0,35
3	63,30	35	0,39
4	82,20	8	0,46

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ცხრილი №16

მიკროსკოპული სოკოების ენდოგლუკანაზების ზოგიერთი ფიზიკო-ქიმიური თვისებები

ენდოგლუ-კანაზა	მოლეკუ-ლური მასა	იზოელექტრული წერტილი	მიხაელისის კონსტანტა (გ/ლ)	ნახშირ-წყლების შემცვე-ლობა (%)	ხვედ-რითი აქტი-ვობა nKat/ml	ნახევრად ინაქტივა-ციის დრო ($\tau_{1/2}$) 65° C
T.reesei (თერმო-ლაბილუ-რი)	68000	5,5	2,8	6,0	300	6 წ.
T.reesei (თერმო-მედეგი)	46000	5,2	1,8	28-29	250	100 წ.
A.terres tris (სუპერ-თერმო-მედეგი)	69000	6,4	6,6	-	500	6 სთ-ში კარგავდა საწყისი აქტივობის 20%
A.bispo-rus						
I	45000	4,8	0,15	-	38,75	8 წ.
II	50000	4,2	0,35	-	52,50	18 წ.
III	52000	4,0	0,39	-	63,30	35 წ.
IV	60000	3,5	0,46	-	82,20	8 წ.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

3.4. სელექციურად შერჩეული A.niger-ის კულტურიდან გლუკოზოოქსიდაზის გაწმენდა და მახასიათებლების დადგენა

ვინაიდან ჩვენი კვლევის შემდგომ მიზანს წარმოადგენდა თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის მატარებელი გენეტიკური მასალის ტრანსფორმაცია, ერთ ერთ მასპინძელ კულტურად ჩვენ გადავწყვიტეთ გამოგვეყენებინა კულტურა A.niger-ი, როგორც სწრაფად მზარდი ორგანიზმი, კულტურა A.terrestris-თან შედარებით.

ამ სამუშაოს წინ უსწრებდა A.niger-ის კულტურის შერჩევა. მიზნათ დავისახეთ შეგვერჩია ისეთი კულტურა რომელსაც შტამ A.terrestris-თან შედარებით აშკარად განსხვავებული გენეტიკური ნიშანთვისება ექნებოდა. ამ ნიშანთვისებად ჩვენ მივიჩნიეთ გლუკოზოოქსიდაზის აქტივობა. უნდა აღინიშნოს რომ A.terrestris-ი არც ერთ არეზე (ძირითადი, ჩაპეკის, ჩაპეკის-დიქსის) არც უჯრედგარეშე, არც უჯრედშიგა გლუკოზოოქსიდაზას კვალის სახითაც კი არ წარმოქმნის. მაშინ როდესაც A.niger-ი საკმაო რაოდენობით აგროვებს უჯრედშიგა გლუკოზოოქსიდაზას. ეს კულტურა სელექციურად შერჩეული იქნა მიცელიალური სოკოების რამოდენიმე ჯიშს შორის კერძოდ: Aspergillus (57 წარმომადგენელი), Fusarium (28), Penicillium (21). ჩვენს მიერ შერჩეული კულტურა A.niger-ი გაცილებით აღემატებოდა ყველა დანარჩენ კულტურას გლუკოზოოქსიდაზის ბიოსინთეზის დონით. ამიტომაც ჩვენ გადავწყვიტეთ შეგვესწავლა აღნიშნული კულტურის გლუკოზოოქსიდაზა რათა გვქონოდა მასპინძელი კულტურის სპეციფიურ დამახასიათებელ ფერმენტზე ინფორმაცია, როგორც ამ კულტურის განსაკუთრებულ ნიშანთვისებაზე.

კულტივირების პირობების შერჩევის შემდეგ, უჯრედი დავშალეთ შუშის ფხვნილთან სრესით და მივიღეთ ექსტრაქტი, სადაც გლუკოზოოქსიდაზის

ეროვნული ბიბლიოთეკა

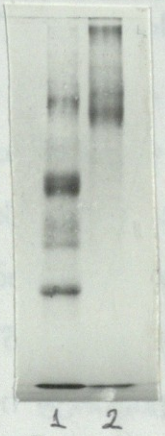
აქტივობა შეადგენდა 0,965 U/mg.

გაწმენდის შემდგომ ეტაპს წარმოადგენდა ჩვენს მიერ შემუშავებული ფაზის მიღება და შემდგომი ქრომოტოგრაფია DEAE-ცელულოზაზე რაც საგრძნობლად ზრდიდა ფერმენტის ხვედრით აქტივობას (ცხრილი №17). როგორც სურ.41-დან ჩანს ამ ეტაპის შედეგად ჩვენ მივიღეთ გომოგენური ფერმენტი რომელიც იდენტიფიცირებული იყო SDS-ელექტროფორეზით. ანალიტიკური იზოელექტროფოკუსირებით დავადგინე რომ ფერმენტის იზოელექტრული წერტილი ტოლი იყო PI=4.2.

ცხრილი №17

გლუკოზოოქსიდაზის აქტივობები გაწმენდის ეტაპებზე

ეტაპის დასახელება	საერთო აქტიობა u/v	ხვედრითი აქტიობა u/mg
ექსტრაქცია	457,24	0,965
ფაზა	255	15,56
იონცვლადი ქრომატოგრაფია	143,1	69,4



სურ.41.8%-იანი SDS-ელექტროფორეზი.
1-მოწმეები (იხ. სურ.7).
2-კულტურა A.niger-იდან გამოყოფილი გლუკოზოოქსიდაზა.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

3.5. მიცელიალური სოკოების A.terrestris-ის და A.niger-ის პროტოპლასტების შერწყმა

ჩვენს მიერ ჩატარებული იქნა ცდების სერია, რომელიც მიზნად ისახავდა მიგვეღო A.terrestris-ის და რომელიმე სხვა სწრაფად მზარდი ორგანიზმის ფუზანტი. ამ მიზნით ავარჩიეთ საფუარი Sacearomices serevisiae და A.niger-ის კულტურები. ლიტერატურაში აღწერილია გენების კლონირების რამოდენიმე განსხვავებული მეთოდი, რომლებიც ცელულაზებთან მიმართებით როგორც წესი სასურველ შედეგს არ იძლევა. ამის ახსნა ბევრი მიზეზის გამო შეიძლება: ცელულაზები (ენდოგლუკანაზები) მყარ და კრისტალურ სუბსტრატზე - ცელულოზაზე, მოქმედებს და ამ ფერმენტების სტრუქტურაში მცირეოდენმა დარღვევამაც კი შეიძლება ისეთი რთული სუბსტრატის ჰიდროლიზის უნარი დააკარგვინოს როგორიც კრისტალური ცელულოზაა. ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი მიზეზი შეიძლება იმაშიც მდგომარეობდეს, რომ ენდოგლუკანაზების უმრავლესობა მოლეკულის შემადგენელ ნაწილად, ნახშირწყლების საკმაო რაოდენობას შეიცავს რასაც ბევრი ორგანიზმი ფერმენტის სინთეზისას ვერ უზრუნველყოფს (143). გარდა ამისა, მცნება "ცელულაზები" აერთიანებს მინიმუმ ორ-სამ ფერმენტს მაინც, რომელთა ერთდროული სინთეზი, კლონირების შედეგად, ძალზედ გართულებულია. ამის დასადასტურებლად შეიძლება მოვიყვანოთ შემდეგი მაგალითი: კორეელი ავტორების მიერ არის აღწერილი, (142) რომ მათ შეძლეს მიეღოთ აქტივობა კლონირებული ორგანიზმის მიერ მხოლოდ მოდელურ სუბსტრატზე (მკც-ზე). რაც შეეხება ბუნებრივ კრისტალურ ცელულოზას, კლონირებული გენიდან მიღებული ფერმენტი მასზე არ მოქმედებს.

როგორც ცდებმა გვიჩვენა, საფუვრის შემთხვევაში, ბევრი მცდელობის მიუხედავად, ვერ მოხერხდა თერმოფილურ სოკოს A.terrestris და მეზოფილური საფუარის S.serevisiae შორის პროტოპლასტების შერწყმა.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ამიტომ ჩვენ გადავწყვიტეთ შემდგომში ამ მიზნისათვის გამოგვეყენებინა კულტურა A.niger-დან მიღებული პროტოპლასტები. პროტოპლასტების შერწყმისათვის გამოვიყენეთ კარგად ცნობილი ტექნიკა (136), და დადებით შედეგებსაც მივაღწიეთ.

შერწყმის შედეგად მიღებულ იქნა 12 ფენოტიპურად განსხვავებული ორგანიზმი, მათ შორის 4-კულტურა გამოირჩეოდა შენელებული სპორების წარმოქმნით (სურ 42,ა,ბ). აღსანიშნავია ის ფაქტიც, რომ ფუზანტების სპორები მსგავსი იყო A.niger-ის სპორებისა, მაგრამ ზომებით განსხვავდებოდა (სურ 43, ა, ბ). რაც შეეხება კულტურა A.terrestris-ს იგი, სპორების წარმოქმნით არ ხასიათდება, რამაც ჩვენის აზრით შესაძლოა გავლენა იქონია შერწყმული ორგანიზმის სპორების წარმოქმნის შენელებაზე და მათ ზომებზე.

აღნიშნული ფენოტიპურად განსხვავებული კულტურები კულტივირებული იყო A.niger-ის საკვებ არეზე და მათ მიერ სინთეზირებული ცილები შედარებულ იქნა ერთმანეთთან ელექტროფორეზულად. როგორც სურ.44-დან ჩანს კულტურა №4-ს გააჩნდა განსხვავებული მოლეკულური მასის მქონე ცილა, მაშინ როცა სხვა კულტურები ცილების ერთნაირ ანაკრებს წარმოქმნიდნენ.

აღნიშნული ფუზანტი და კულტურა A.niger-ი კულტივირებული იყვნენ A.terrestris-ის საკვებ არეზე. აღსანიშნავია, რომ ამ არეზე A.niger-ი არ ასინთეზებდა ენდოგლუკანაზებს, ხოლო მიღებული კულტურა საგრძნობ აქტივობას გვაძლევდა, რომელიც 5,74 nkat/ml-ის, ტოლი იყო. ფერმენტის ნახევრადინაქტივაციის დრო, 65°-ის პირობებში, სუბსტრატის გარეშე შეადგენდა 40 წთ-ს, ეს მიცელალური სოკოების კარგ მაჩვენებლად ითვლება.

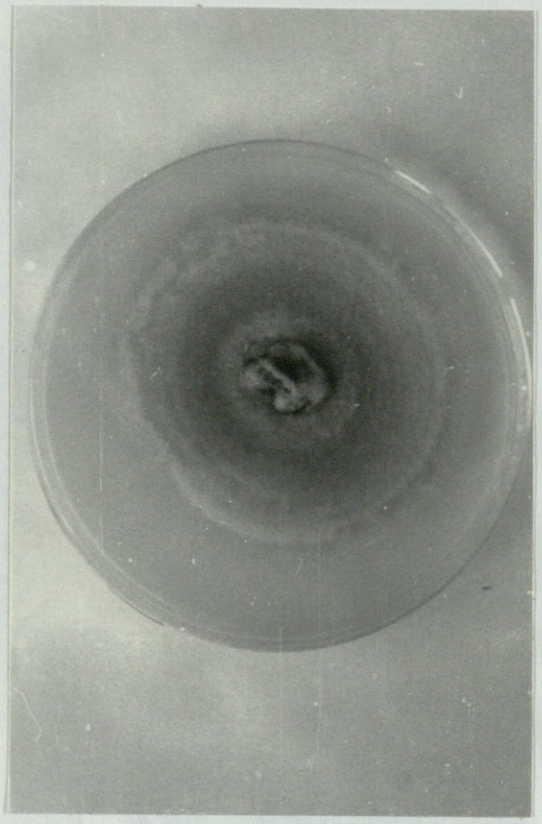
საინტერესო მონაცემები იქნა მიღებული იზოელექროფოკუსირებით A.niger-ის და №4 ფუზანტის, გაზრდილს A.niger-ის საკვებ არეზე A.terrestris-სა და ფუზანტ №4-ს, გაზრდილს A.terrestris-ის საკვებ არეზე, შე-

ეროვნული ბიბლიოთეკა

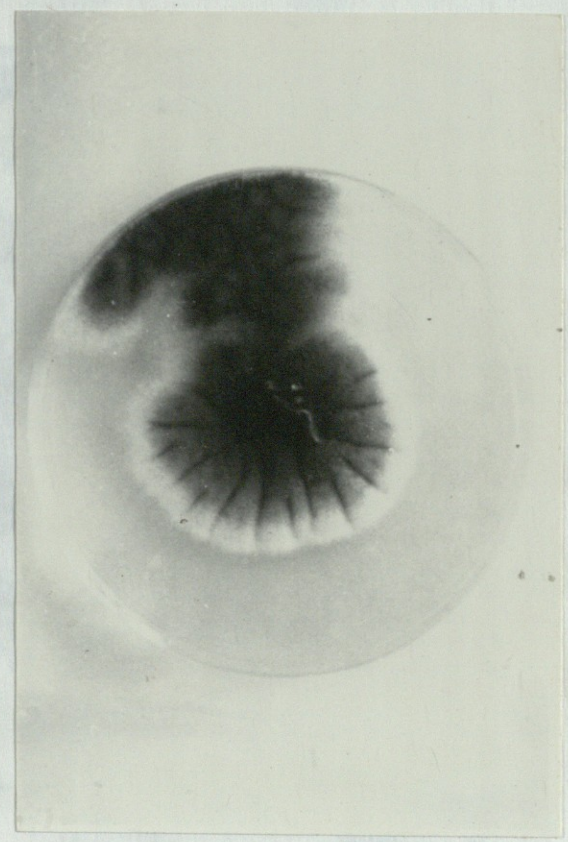
დარებისას (სურ.44). როგორც ამ სურათიდან ჩანს ფუზანტი №4 ასინთეზირებს როგორც ორივე კულტურისათვის დამახასიათებელ ცილებს, ასევე მათგან განსხვავებულსაც. როგორც ზიმოგრამულმა აქტივობამ დაგვანახა (სურ 45) კულტურა №4 ასინთეზირებს A.niger-ის იდენტურ ენდოგლუკანაზებს როცა იგი იზრდება A.niger-ის არეზე და ერთერთ ენდოგლუკანაზას A.terrestris-ის იდენტურს როცა იგი იზრდება A.terrestris-ის არეზე. თუ გავითვალისწინებთ იმ ფაქტს რომ A.niger-ი, A.terrestris-ის არეზე ენდოგლუკანაზებს, საერთოდ არ ასინთეზებს ზემოთ მოყვანილი მონაცემებიდან გამომდინარე შეგვიძლია დავასკვნათ რომ ფუზანტი №4 წარმოადგენს ისეთ ორგანიზმს რომელსაც, ახასიათებს ცილოვანი სპექტრის კომპონენტები დამახასიათებელი A.terrestris-თვის, მეზოფილურ სოკოს A.niger-თვის, და ზოგიერთი ახალიც. ფუზანტის განსაკუთრებულად მნიშვნელოვან თვისებად უნდა ჩაითვალოს ის გარემოება, რომ A.niger-ის არეზე კულტივირებისას, ფუზანტი აგროვებს უჯრედსშიდა გლუკოზოოქსიდაზის ორჯერ უფრო მაღალ აქტივობას, მშრალი ბიომასის ერთეულზე გადაანგარიშებით.

სამწუხაროდ ამ ეტაპზე არ მოხერხდა თერმოფილური, ჯეშმარიტად აქტიური ტრასფორმანტის მიღება, სამაგიეროდ, ჩვენს მიერ ჩატარებულმა კვლევამ ნათელყო თერმოფილური და მეზოფილური კულტურებიდან გამოყოფილი პროტოპლასტების შერწყმის შესაძლებლობა. ფუზანტის მიერ წარმოქვნილი ენდოგლუკანაზა ($\tau_{1/2}$-40წთ, 65°-ზე) ვერ ავლენს A.terrestris-ის ენდოგლუკანაზის ანალოგიურ თერმომედეგობას, სამაგიეროდ, მნიშვნელოვნად სჯარბობს ამ მაჩვენებლით A.niger-ის ენდოგლუკანაზას ($\tau_{1/2}$-5წთ, 65°-ზე). გარდა ამისა, აღსანიშნავია, რომ მიღებული ფუზანტი სტაბილურად ინარჩუნებს ორივე დედა კულტურისათვის დამახასიათებელ ნიშანთვისებებს.

ეროვნული ბიბლიოთეკა



ა

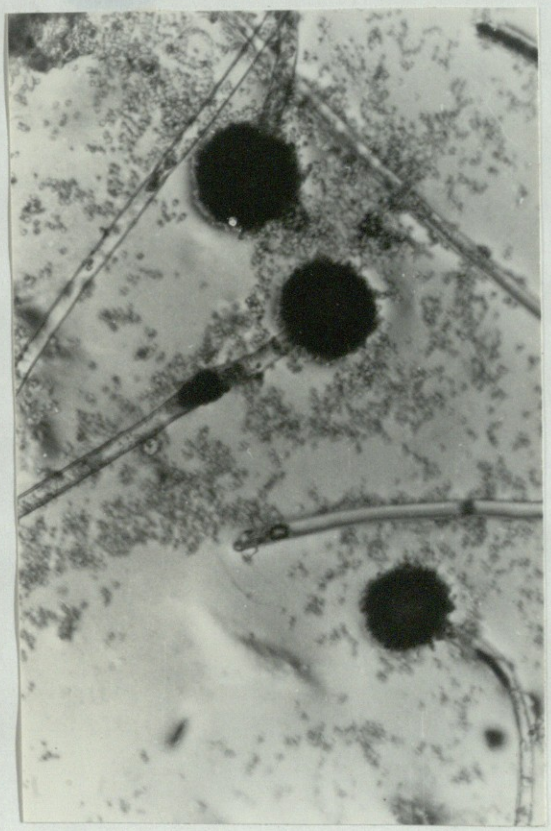


ბ

სურ. 42. A.niger-ისა და ფუზანტის 56 საათიანი კულტურები.
ა)ფუზანტი, ბ)A.niger-ი.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

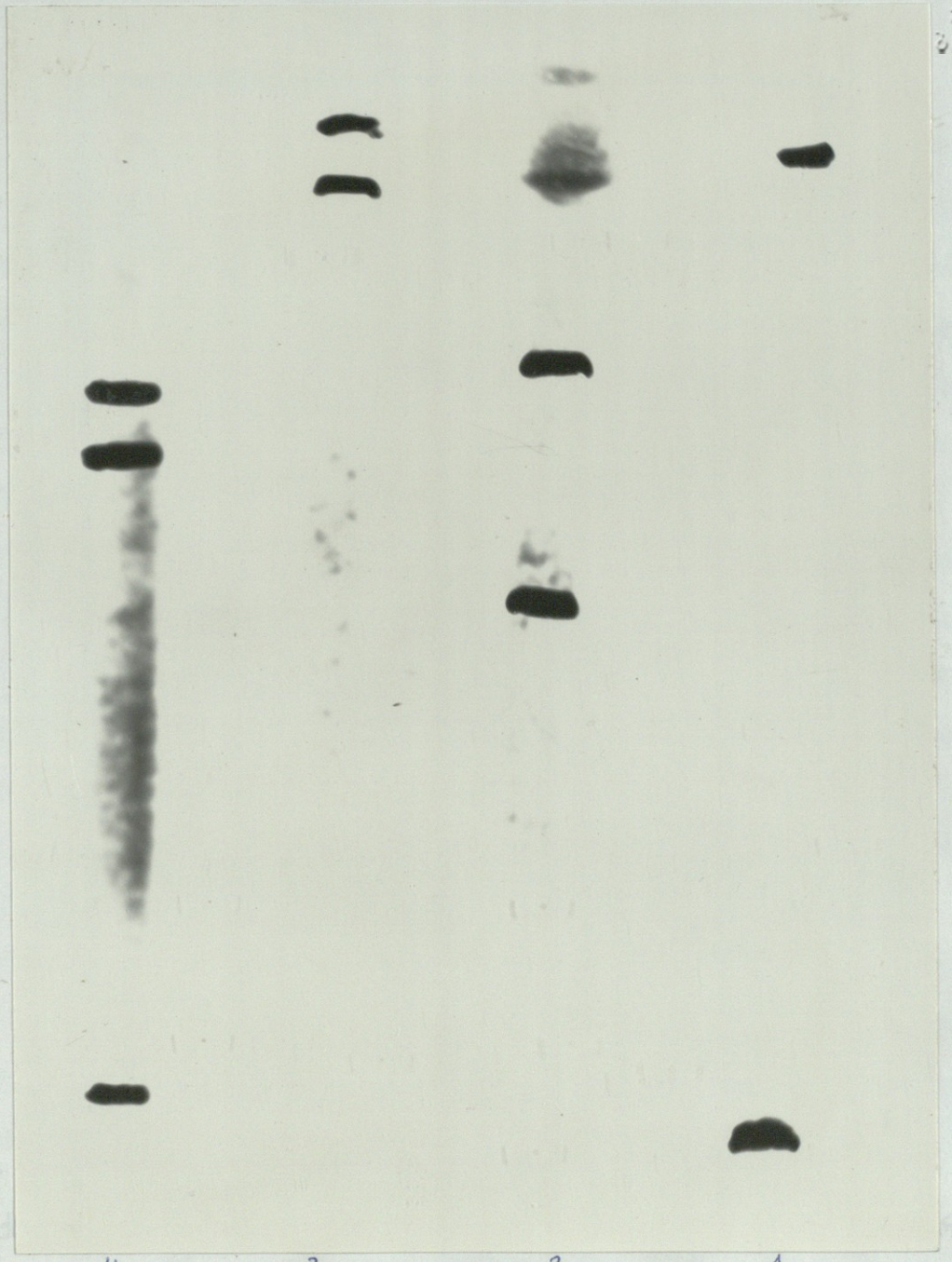
ა



ბ

სურ. 43 A.niger-ისა და ფუზანტის რეპროდუქციული სხეულები.
ა)ფუზანტი, ბ)A.niger-ი.

ეროვნული ბიბლიოთეკა



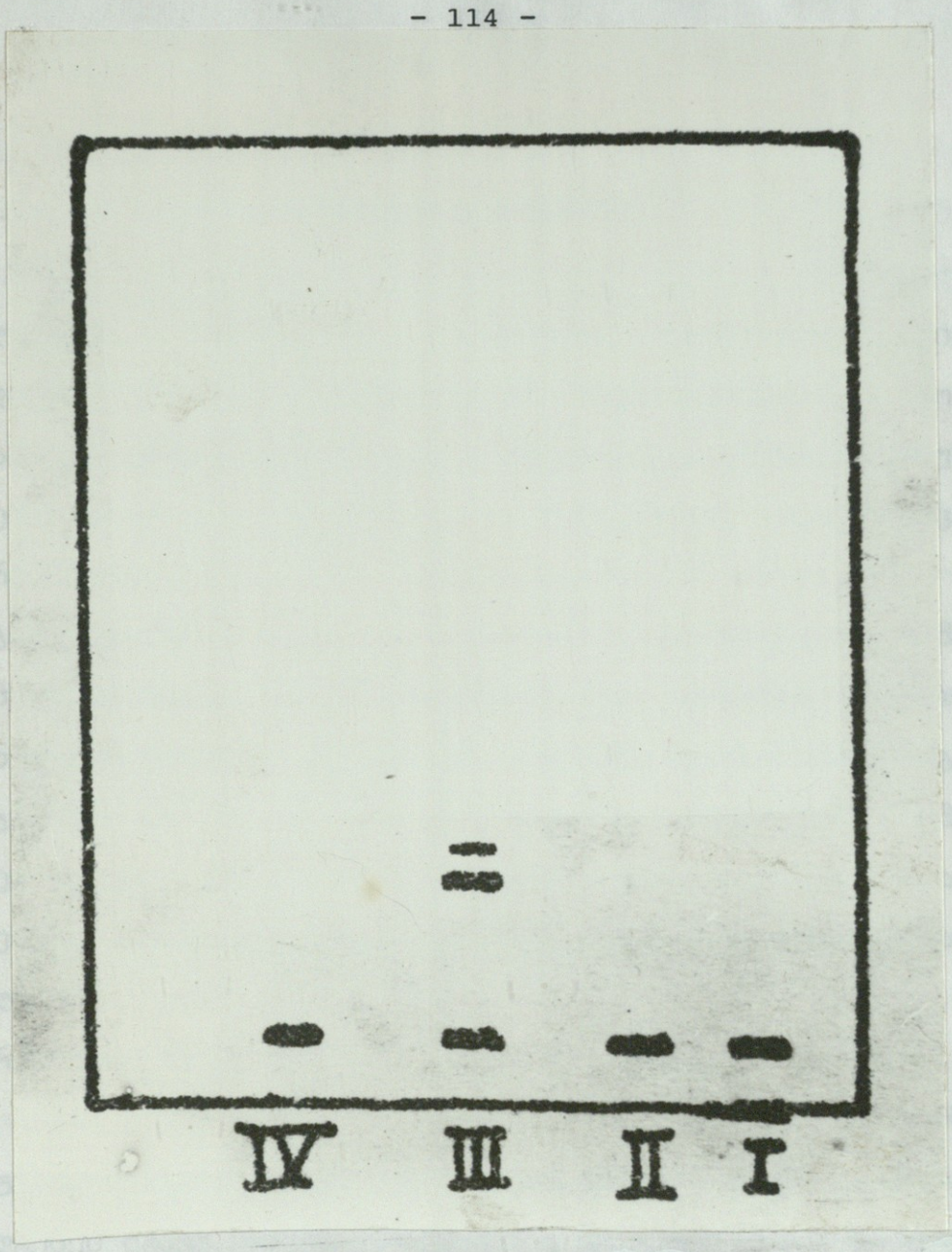
4 3 2 1

სურ. 44. იზოელექტროფოკუსირება პოლიაკრილამიდის გელის ფირფიტაზე ამფოლინების გრადიენტით pH 3,5-9,5.

1-კულტურა A.nigeri, 2-ფუზანტი, გაზრდილი A.nigeri-ის არეზე,

3-კულტურა A.terrestris, 4-ფუზანტი, გაზრდილი A.terrestris-ის არეზე.

ეროვნული ბიბლიოთეკა



სურ. 45. ზიმოგრამული აქტივობა გადაღებული სურ. 44
იზოელექტროფოკუსირებიდან. ბილიკების თანმიმდევრობა ემთხვევა სურ. 44.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

IV თ ა ვ ი

შედეგების განხილვა

ცელულოზის სამრეწველო მასშტაბით ფერმენტული ჰიდროლიზი წარმოადგენს ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ბიოტექნოლოგიის პრობლემას. ვინაიდან ცელულოზა განახლებადი რესურსია და მისი გადამუშავების ნარჩენების დაგროვება ხდება საკმაო რაოდენობით, მათი ლიკვიდაცია, არის არა მარტო ტექნოლოგიური, არამედ ეკოლოგიური პრობლემაც.

ლიგნოცელულოზური მასის ჰიდროლიზთან დაკავშირებულია რამოდენიმე პრინციპული პრობლემა, რომლის გადაწყვეტაზეც მუშაობენ მსოფლიოს ბევრ წამყვან ლაბორატორიებში იაპონიაში, აშშ-ში, გერმანიაში, ინგლისში, საფრანგეთში და სხვა. ერთ-ერთ ძირითად პრობლემას წარმოადგენს ლიგნოცელულოზური მასალის კრისტალური სტრუქტურის დაშლა, რაც გართულებულია პოლისაქარიდების ქსილანის, პექტინის, ქიტინის და სხვათა შემცველობით.

მერქნოვანი მასის დაშლის შედეგად გამოიყოფა ლიგნინი, რომელიც იწვევს არის გატუტიანებას და როგორც წესი ხელს უშლის ჰიდროლიზური ფერმენტების მოქმედებას. ეს უკანასკნელნი უმეტეს შემთხვევაში წარმოადგენენ მჟავე ცილებს, მოქმედების pH ოპტიმუმით 2-5-მდე (144).

აღსანიშნავია ის ფაქტი, რომ პოლისაქარიდების ჰიდროლიზის დროს მნიშვნელოვანი პრობლემაა სარეაქციო არის მიკრობული დაბინძურება. ვინაიდან, ჰიდროლიზის საბოლოო პროდუქტებია გლუკოზა და სხვა დაბალმოლეკულური შაქრები, მათ შორის პენტოზებიც, რომელთა ერთიანობაც წარმოადგენს კარგ არეს პრაქტიკულად ყველა ტაქსონომიური ჯგუფების მიკროორგანიზმების ინფექციისათვის. იმისათვის რომ თავიდან ავიცილოთ ან მინიმუმამდე შევამციროთ მიკრობული დაბინძურების შესაძლებლობა, აუცილებელია რეაქციის წარმართვა მაღალი ან დაბალი pH-ის, ან მაღალი

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ტემპერატურული რეჟიმის პირობებში.

ზემოთ თქმულიდან გამომდინარე საკმაოდ მნიშვნელოვანია ფერმენტების მოქმედების pH ოპტიმუმი და თერმომედეგობა. კერძოდ, ლიგნოცელულოზური მასალის ჰიდროლიზის დროს დიდი მოთხოვნილებაა იმ ფერმენტების მიმართ, რომელთა pH ოპტიმუმი 6-8 დიაპაზონშია. რაც შეეხება რეაქტორის დაბინძურებას, ეს შეიძლება თავიდან ავიცილოთ ტექნოლოგიური პროცესის 65°-ზე პასტერიზაციის ტემპერატურაზე წარმართვით. აქედან გამომდინარე საჭირო ხდება თერმომედეგი ფერმენტების და მათი აქტიური პროდუცენტების ძიება.

თერმომედეგი ფერმენტების პროდუცენტების მოძებნა არ არის მხოლოდ ტექნოლოგიური პრობლემა. უმეტეს შემთხვევაში იგი დაკავშირებულია იმ ამოცანებთან, რომელთა გადაწყვეტა შეიძლება მოხდეს მოლეკულური ბიოლოგიის დონეზე. ხშირ შემთხვევაში კულტივირების გარკვეულ პირობებში შესაძლოა მოიძებნოს და "ჩაირთოს" ორგანიზმში არსებული "რეტრო" გენი, რომლის კლონირებაც დადებით გავლენას იქონიებს ზემოთ აღწერილი ტექნიკური პროცესის წარმართვაზე.

ინტერესი ამ საკითხის მიმართ კიდევ უფრო გაიზარდა მას შემდეგ, რაც გამოვლინდა თერმომედეგი ცელულაზები, რომლებიც მოქმედებენ პასტერიზაციის ტემპერატურაზე (65°). კერძოდ, მეზოფილური კულტურა Trichoderma reesei-ის ფერმენტული პრეპარატიდან გამოყოფილი იქნა ენდოგლუკანაზის მინორული თერმომედეგი კომპონენტი (128). კულტურა T.reesei-დან ჩვენს მიერ გამოყოფილი ენდოგლუკანაზის მინორული კომპონენტის მოლეკულური მასა, მიხაელისის მუდმივა და იზოელექტრული წერტილი ემთხვეოდა მეზოფილური წარმოშობის ცელულაზებს (67-72). სამაგიეროდ ფერმენტის თერმომედეგობა ბევრად აღემატება ლიტერატურაში აღწერილ მეზოფილური კულტურების ენდოგლუკანაზების თერმომედეგობას. ენდოგლუკანაზის მინორული კომპონენტის ნახევრადინაქტივაციის დრო,

ეროვნული ბიბლიოთეკა

სუბსტრატის გარეშე, შეადგენდა 100 წთ-ს, მაშინ, როცა იმავე პირობებში ჩვენს მიერ გამოყოფილი ძირითადი კომპონენტისათვის იგი ტოლი იყო 6 წთ-ს (სურ.10).

თერმომედეგობის მაჩვენებელი საგრძნობლად იზრდებოდა სუბსტრატის თანაობის შემთხვევაში, და აღწევდა 1440 წთ. (სურ.9).

აღნიშნული ფერმენტის სხვა ფიზიკო-ქიმიური თვისებები შეესაბამება ლიტერატურაში აღწერილ T.reesei ფერმენტებს (145).

აღსანიშნავია ის ფაქტი, რომ ერთერთი სამრეწველო მუტანტი T.reesei QM9414 არის კლასი კური მეზოფილი ზრდის ტემპერატურული ოპტიმუმით 30° და რა თქმა უნდა ამ კულტურის ფერმენტულ კომპლექსში თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის არსებობა თუნდაც მინორული ფრაქციის სახით მიუთითებს მისი გენეტიკური ინფორმაციის უნიკალურობაზე. ალბათ ეს უნდა იყოს "რეტრო" ტიპის გენი, რომელმაც დროთა განმავლობაში განიცადა რეპრესია. მიცელიალური სოკოები ძველი ეუკარიოტული ორგანიზმებია რომლებიც ითვლიან არანაკლებ 5-7 მილიარდ წელს, ეს კი გვაძლევს იმის საშუალებას ვივარაუდოთ რომ თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის გენი ალბათ იყო ძირითადი და კლიმატურ ცვლილებებთან ერთად მოხდა მისი აქტივობის რეპრესია. ყოველ შემთხვევაში დღეს არსებობს იმის რეალური შესაძლებლობა რომ ამ გენის კლონირება მოხდეს სხვა მიკროორგანიზმებში ან გაიზარდოს გამოსავალი საწყის კულტურაში.

კულტურა T.reesei-ის ცელულაზების კომპლექსი საკმაოდ კარგად არის შესწავლილი და აღწერილი ლიტერატურაში (67-72,74-81). თერმომედეგობის მაჩვენებელი, რომელიც მიღებულია ჩვენს მიერ თერმომედეგ ენდოგლუკანაზისათვის 16-ჯერ აღემატება ამავე კულტურის ფერმენტული კომპლექსიდან გამოყოფილ მაჟორულ კომპონენტს.

მას შემდეგ რაც აღმოჩნდა, რომ მეზოფილური კულტურა T.reesei წარმოქმნიდა ენდოგლუკანაზის თერმომედეგ მინორულ კომპონენტს,

ეროვნული ბიბლიოთეკა

მიცელალურ სოკოებში ენდოგლუკანაზების თერმომედეგობის პოტენციალის დასადგენად მიზანშეწონილად მივიჩნიეთ ჩაგვეტარებინა სკრინინგი თერმოფილურ მიცელალურ მიკროორგანიზმებში. თუ მეზოფილური სოკოების ცელულაზები და მათ შორის ენდოგლუკანაზა კარგად არიან დახასიათებულნი ლიტერატურაში თერმოფილების ცელულაზებზე ინფორმაცია ძალზედ მცირეა. არსებული ლიტერატურული მონაცემები (146) მიუთითებენ იმაზე რომ თერმოფილური მიცელალური სოკოები ხშირად წარმოქმნიან მათ მეზოფილურ ანალოგებთან შედარებით უფრო თერმომედეგ ენდოგლუკანაზებს. მაგრამ არაფერია ცნობილი იმასთან დაკავშირებით თუ თერმომედეგობის რა პოტენციალი გააჩნიათ ამ კლასის მიკროორგანიზმებს და რამდენად შესაძლებელია თერმოფილური მიცელალური სოკოების ენდოგლუკანაზების ფართო მასშტაბით გამოყენება მრეწველობაში, სადაც მოთხოვნილება მინიმალური სარეაქციო არის ტემპერატურის მიმართ უდრის 65°-ს (პასტერიზაციის ტემპერატურა).

ამ მიზნისათვის გამოვიყენეთ საქართველოს რესპუბლიკის მეცნიერებათა აკადემიის დურმიშიძის სახელობის მცენარეთა ბიოქიმიის ინსტიტუტის ბიოტექნოლოგიის ლაბორატორიის მიკრომიცეტების კოლექცია. კულტურების ზრდა მიმდინარეობდა 40°-ზე. იმისათვის, რომ ყველა კულტურისათვის შეგვექმნა ზრდის ერთნაირი პირობები, ნახშირბადის ერთადერთ წყაროდ გამოვიყენეთ მიკროკრისტალური ცელულოზა. ამ შემთხვევაში ყველა კულტურამ ჯეშმარიტად გამოამჟღავნა ენდოგლუკანაზების ბიოსინთეზის უნარი. რამდენიმე კულტურის (A. terrestris, C. thermophile, A. versicolor) ენდოგლუკანაზების თერმოინაქტივაციის შესწავლისას პასტერიზაციის ტემპერატურაზე (65°) გამოვლინდა ამ კულტურების მიერ სინთეზირებული ფერმენტების საკმაოდ მაღალი მედეგობა.

საყურადღებოა ისიც, რომ ტემპერატურის მატებისას მკც, როგორც

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ნახშირბადის წყარო, თავისი მაღალი კრისტალურობის გამო, ხდებოდა ძნელად შესათვისებელი ზოგიერთი კულტურისათვის, ამიტომ მთელი რიგი ცდებისა ჩატარებული იყო გლუკოზაზე, როგორც შედარებით ადვილად შესათვისებელ ნახშირბადის წყაროზე, 50°-ზე უფრო მაღალი ტემპერატურის პირობებში.

შესწავლილია, რომ 40-45° ტემპერატურულ ინტერვალში ყველა ჩვენს მიერ გამოკვლეული ცელულაზების პროდუცენტი თერმოფილები წარმოქმნიან დამახასიათებელ აქტივობებს მკც-ზე ზრდისას (ცხრილი 9).

პირველი ტემპერატურული ზღვარი, რომლის დროსაც მკც-ზე ზრდისას, უკრედგარე ენდოგლუკანაზური აქტივობა აღმოჩნდა ნულის ტოლი, იყო 45°. 45-50° ტემპერატურული ინტერვალის მიმართ მდგრადი აღმოჩნდა ორი კულტურა: **Allesheria terrestris** და **Chaetomium thermophile**. მე-10 ცხრილში ნაჩვენებია ამ პროდუცენტების, ენდოგლუკანაზური და ფილტრის ქაღალდის აქტივობები. დანარჩენი მიკრომიცეტებისათვის ამ პირობებში დამახასიათებელი იყო ძალზედ სუსტი ზრდა და პრაქტიკულად არ აღინიშნებოდა დეტექტირებადი ენდოგლუკანაზური აქტივობა. მაშასადამე 48-49° შეიძლება ჩაითვალოს მეორე ტემპერატურულ ზღვრად, რომელიც უზრუნველყოფს კულტურის მაღალ ტემპერატურაზე ზრდის დროს პრინციპულად უფრო თერმომედეგი ენდოგლუკანაზების ბიოსინთეზს. ყოველივე ეს ჩვენი ვარაუდით განპირობებული უნდა იყოს ტემპერატურის რეპრესულ-აქტივაციური მექანიზმით.

ეს აღბათ საინტერესო ეფექტია რომლისთვისაც ადრე ყურადღება არავის მიუქცევია და სწორედ ახლა, როცა თერმომედეგ ფერმენტებს დიდი ყურადღება ექცევათ აღბათ მიზანშეწონილია ამ ეფექტის სხვა მიკროორგანიზმებზეც შემოწმება მცენარეთა ბიოქიმიის ინსტიტუტში არსებული მიკროორგანიზმების კოლექციაში შესწავლილია თერმოფილური მიცელიალური სოკოების მაღალი ტემპერატურის მიმართ ადაპტაციის უნარი

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ცელულოზის შემცველ საკვებ არეზე ყველაზე მაღალი ტემპერატურული რეჟიმში ზრდის მიხედვითა შერჩეულია კულტურა **Allesheria terrestris**-ის სუპერთერმომედეგი ენდოგლუკანაზის წარმომქმნელი შტამი. ეს ფერმენტი 65^{0}-ის პირობებში სუბსტრატის გარეშე 6 საათის ინკუბაციის შემდეგ კარგავს საწყისი აქტივობის მხოლოდ 20%. ხაზგასმით უნდა აღინიშნოს, რომ მიცელალურ სოკოებში და საერთოდ ეუკარიოტებში ამ დონის თერმომედეგობის მქონე ფერმენტის და კონკრეტულად ენდოგლუკანაზის ინფორმაცია ჩვენს მხედველობის არეში არ მოხვედრილა. 48-49°-ზე უფრო მაღალ ტემპერატურაზე თერმოფილური კულტურები მკც-ზე წყვეტდნენ ზრდას და ცელულაზების სინთეზს. ის გარემოება, რომ მკც-ზე გაზრდილი კულტურების ენდოგლუკანაზური აქტივობები ყოველთვის მეტია, ვიდრე გლუკოზის შემთხვევაში, კანონზომიერია, რადგანაც მკც ერთდროულად არის ცელულაზების სუბსტრატიც და ინდუქტორიც, გლუკოზა კი ჟაკობ-მანოს სქემის თანახმად (147) იწვევს კარბოჰიდრატების ბიოსინთეზის ინჰიბირებას.

რაც შეეხება ბუნებრივ ნახშირბადის წყაროს ვუდის (141), მიერ 1987 წელს აღწერილია იქნა ცელულაზების ბიოსინთეზის დონის მატება, როდესაც კულტივირებისას ნახშირბადის წყაროდ გამოყენებული იქნა ნამჯა (141). აქტივობის მატება შედარებული იყო იმ ცდებთან, სადაც გამოიყენეს წმინდა ცელულოზის შემცველი ნახშირბადის წყაროები, როგორიც არის მკც და ფილტრის ქაღალდი. ამრიგად, გლუკოზა, როგორც ნახშირბადის წყარო, შევიტანეთ იმისათვის, რომ დაგვედგინა პროდუცენტების ზრდის ზღვრული ტემპერატურა ადვილად მეტაბოლიზირებად სუბსტრატზე. ასეთმა მიდგომამ საშუალება მოგვცა დაგვედგინა, რომ კულტურები: **A. wentii, A. versicolor, A.terreus** და **S. pulverulentum** წყვეტენ ზრდას გლუკოზაზე 51-54° ტემპერატურულ ინტერვალში, რომლებიც ბილაის (148) კლასიფიკაციის თანახმად შეიძლება მივაკუთვნოთ მეზოთერმოფილებს.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

კულტურა Allesheria terrestris-ი კარგად იზრდება გლუკოზიან არეზე 60-62° ტემპერატურამდე და წარმოადგენს ექსტრემალურ თერმოფილს ზრდის ტემპერატურული ოპტიმუმით 45-48°. აქედან გამომდინარე ჩავთვალეთ, რომ ეს შტამი იქნებოდა ყველაზე უფრო პერსპექტიული ენდოგლუკანაზების თერმომედეგობის პოტენციალის დადგენის თვალსაზრისით.

ბაზიდიალური სოკოებიდან ფონური აქტივობის მნიშვნელობას იძლეოდა კულტურა A.bisporus-ი, რომელიც შევადარეთ კულტურა A.terrestris-ს. აღნიშნული სოკოები წარმოადგენენ სხვა და სხვა კლასის ორგანიზმებს, სადაც A.terrestris-სი არის აშკარა თერმოფილი, ხოლო A. bisporus-სი წარმოადგენს მეზოფილების კლასიკურ მაგალითს. როგორც ცნობილია ბაზიდიალური სოკოები წარმოქმნიან ლიგნინაზური აქტივობის მქონე ფერმენტებს და მათთვის კარგი საკვები არეა ბუნებრივი ნედლეული, მათ შორის ნამჯა, რომელიც გამოყენებული იქნა ნახშირბადის წყაროდ ამ ორი ორგანიზმის შედარებისას. როგორც მე-13,14 ცხრილიდან ჩანს ნამჯა წარმოადგენს საკმაოდ კარგ ნახშირბადის წყაროს, რაც გამოიხატება A.terrestris-ის აქტივობის 2-ჯერ და მეტჯერ მატებაში, მკც-სთან შედარებით, ორგანიზმების მკც-ზე ზრდასთან. ნამჯის ეფექტი სხვა სახის მიკროორგანიზმებზეც არის აღწერილი ვუდის მიერ (141). ცნობილია რომ მკც 99%-ზე მეტით შედგება ცელულოზისაგან, ხოლო ნამჯა გარდა ცელულოზისა, შეიცავს საკმაო რაოდენობით (50-60%) ლიგნინს, ქსილანს და სხვა პოლიმერულ და დაბალმოლეკულურ ნაერთებს, რამაც შესაძლოა გამოიწვიოს ამ ორგანიზმის მიერ აქტიური ფერმენტების ბიოსინთეზი. თუმცა როგორც მიკროსკოპულმა გამოკვლევამ გვიჩვენა თვითონ მიკროორგანიზმები (A.bisporus და A.terrestris) პრინციპიალურად განსხვავდებიან ნამჯის დაშლის მექანიზმით.

როგორც გვიჩვენა ელექტრონულ მიკროსკოპულმა კვლევამ (სურ 29), შტამი A.bisporus-სი ნამჯის დაშლას იწყებს ზედაპირიდან, სადაც

ეროვნული ბიბლიოთეკა

უმთავრესად გროვდება მიცელიუმი და მხოლოდ შემდეგ გადადის მის შიდა ნაწილში. ხოლო A.terrestris-ი იზრდება ნამჯის შიგნით, აწარმოებს მის დაშლას, წარმოქმნილი მექანიკური ნაპრალების საშუალებით ახერხებს ნამჯის ზედაპირზე ამოსვლას სურ.22-26. დღეისათვის ჩვენს ხელთ არსებული მონაცემები არ იძლევიან საშუალებას ავხსნათ ამ სოკოების ზრდის ასეთი განსხვავებული მექანიზმები.

სკანირებული მიკროსკოპის საშუალებით შევძელით დაგვედგინა თუ როგორ ხდება ბუნებრივი ნამჯის დაშლის პროცესი. როგორც სურ. (31-34) ჩანს პირველ ეტაპზე მიკროორგანიზმის ბიომასა ადსორბირდება სუბსტრატზე, რაც იწვევს ნამჯის ამ უბნის სტრუქტურის შეცვლას სურ. (31,32). ჩვენი ვარაუდით, აღნიშნული ცვლილება შეიძლება შედეგი იყოს ნამჯის კედლის ქსილანის და ცელულოზის დაშლის და ლიგნინის გამონთავისუფლებისა. დროის განმავლობაში ალბათ ადგილი აქვს ცელულოზის და ქსილანის სრულ დაშლას რაც შესაძლებელს ხდის ლიგნინის მთლიან ელიმინირებას (სურ 33,34).

ვინაიდან ნამჯა წარმოადგენს ბუნებრივი ბიოპოლიმერების და სხვა ნაერთების ერთობლიობას, რთულია იმის დადგენა თუ რომელი მათგანია პასუხისმგებელი ენდოგლუკანაზების აქტივობის მატებაზე. ამიტომ ჩვენს მიერ მოდელურ ცდებში გამოყენებული იყო მკც, როგორც ინდივიდუალური ნაერთი.

რადგან, კულტურა Allesheria terrestris ამჟღავნებდა უფრო მაღალ ენდოგლუკანაზურ აქტივობას ზრდის მაღალი ტემპერატურული რეჟიმის დროს, ჩვენს მიერ შერჩეული იქნა ეს კულტურა, როგორც თერმომედეგი ცელულაზების ძირითადი პროდუცენტი.

იმისათვის, რომ დაგვედგინა თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის ბიოსინთეზის ოპტიმალური პირობები, კულტურა გავზარდეთ სხვადასხვა ტემპერატურებზე, კერძოდ 40,45,48°-ზე. ნახშირბადის წყაროდ

ეროვნული ბიბლიოთეკა

გამოვიყენეთ მიკროკრისტალური ცელულოზა. ენდოგლუკანაზების თერმოინაქტივაციამ პასტერიზაციის ტემპერატურაზე (65°) სუბსტრატის გარეშე დაგვანახა, რომ სხვადასხვა ტემპერატურაზე სინთეზირებული ენდოგლუკანაზები ხასიათდებოდნენ სხვადასხვა თერმომედეგობით (სურ 11). კერძოდ, 48°-ზე გაზრდილი კულტურის მიერ სინთეზირებული ენდოგლუკანაზა 65°-ინკუბაციისას, სუბსტრატის გარეშე, განიცდის მხოლოდ ნაწილობრივ ინაქტივაციას (20%), 6 საათის ინკუბაციის შემდეგ, მაშინ როცა ნახევრად ინაქტივაციის დრო 40°-ზე მიღებული ენდოგლუკანაზისათვის შეადგენდა 20 წთ-ს, ხოლო 45°-ზე მიღებულისათვის - 45 წთ-ს. ჩვენის აზრით ეს მონაცემები უტყუვრად მიუთითებენ იმაზე რომ ამ შემთხვევაში საქმე გვაქვს განსხვავებული ცილის სიეთეზთან de novo.

გარდა ამისა, თერმოფილური კულტურა A. terrestris ხასიათდებოდა ქსილანაზური აქტივობით. მე-12 სურათზე ნაჩვენებია სხვადასხვა ტემპერატურებზე გაზრდილი A. terrestris-ის კულტურალური სითხის ქსილანაზური აქტივობის ვარდნა 65°-ზე ინკუბაციისას. როგორც ამ სურათიდან ჩანს 48°-ზე კულტივირებული ორგანიზმის როგორც ენდოგლუკანაზური, ასევე ქსილანაზური აქტივობა, ძალზედ მაღალი თერმომედეგობით ხასიათდებოდა. 48-ზე გაზრდილი კულტურის, ფერმენტის საწყისი ქსილანაზური აქტივობა, შეადგენდა 3,62nKat/mg, რაც კარგად დეტექტირებადი რაოდენობაა.

ის გარემოება, რომ კულტურალურ ფილტრატში ისაზღვრება არა მარტო თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის, არამედ თერმომედეგი ქსილანაზის აქტივობები და ისინი ერთ ფერმენტს ეკუთვნიან, გვაძლევს საშუალებას, რომ სუპერთერმომედეგი ენდოგლუკანაზა, რომელიც ხასიათდება ბიფუნქციონალური თვისებით, მივაკუთვნოთ ენდოგლუკანაზების II ან III ჯგუფს.

მაშასადამე, რადგან ჩვენი მიზანი იყო თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის

ეროვნული ბიბლიოთეკა

შესწავლა, ამიტომ კულტივირების ტემპერატურად შევარჩიეთ 48-49°-ი.

მე-11 ცხრილში მოყვანილია ამ ტემპერატურაზე გაზრდილი კულტურა A. terrestris-ის სხვადასხვა აქტივობების მონაცემები.

საკმაოდ საინტერესოა, რომ კულტურას ზრდის სხვადასხვა ტემპერატურულ რეჟიმში აქვს უნარი ფერმენტის უფრო თერმომედეგი ფორმები წარმოქმნის. ბევრი ფაქტი მოწმობს იმაზე, რომ სხვადასხვა ნაერთები ავლენენ პრომოტორის აქტივაციურ ან ინჰიბიტორულ თვისებებს, მაგრამ ის გარემოება, რომ ტემპერატურის ვარირებით ხდებოდეს ამა თუ იმ გენის "ჩართვა" ლიტერატურაში არ შეგვხვედრია.

ზემოთ აღნიშნული მსჯელობის დასასაბუთებლად დავაყენეთ უჯრედგარე ფერმენტების SDS-გელ ელექტროფორეზი (სურ.13). როგორც ამ სურათიდან ჩანს 48° და 40° ტემპერატურებზე გაზრდილი კულტურის მიერ სინთეზირებული ზოგიერთი ცილები, განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან მოლეკულური მასებით. იმის დასადგენად, თუ რომელი ცილები ავლენდნენ უფრო მეტ თერმომედეგობას დავაყენეთ საწყისი და 65° ტემპერატურაზე ინაქტივირებული უჯრედგარე ფერმენტების ანალიტიკური იზოელექტროფოკუსირება (სურ.14). გელში განსაზღვრული იქნა ენდოგლუკანაზური აქტივობა ზიმოგრამულად. როგორც ამ სურათებიდან ჩანს I და II ბილიკები განსხვავდებიან III და IV ბილიკებისაგან. I ბილიკზე შევიტანეთ 48° ტემპერატურაზე გაზრდილი კულტურა A.terrestris- ის მიერ სინთეზირებული უჯრედგარე ცილები, ხოლო II ბილიკზე შეტანილი იქნა იგივე ნიმუში დამუშავებული 65° ტემპერატურაზე, ნსთ-ის განმავლობაში. როგორც აქტივობის ზიმოგრამულად განსაზღვრიდან ჩანს, აქტივობა შენარჩუნებული აქვს ენდოგლუკანაზების მხოლოდ ერთ ფორმას, მაშინ როცა სხვა ენდოგლუკანაზების აქტივობის ზონები ნათლად ჩანს I ბილიკზე. IV ბილიკზე დატანილი იყო 40°-ზე გაზრდილი ამავე კულტურის უჯრედგარე ფერმენტები, ხოლო III-ზე იგივე ნიმუში დამუშავებული 65°

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ტემპერატურაზე ნსთ-ის განმავლობაში. აღმოჩნდა, რომ III ბილიკზე აქტივობა არ არის შენარჩუნებელი, მაშინ, როცა IV ბილიკზე ენდოგლუკანაზური აქტივობა გამოავლინეს ენდოგლუკანაზის ფორმებმა pH 4,5-დან pH 7,6-მდე. ეს კიდევ ერთხელ ამტკიცებს იმას, რომ მაღალ ტემპერატურულ რეჟიმებში კულტივირებისას შტამი A.terrestris-ი სავსებით შესაძლებელია წარმოქმნიდეს ენდოგლუკანაზის ახალ თერმომედეგ ფორმას.

აღსანიშნავია აგრეთვე, რომ კულტურა A.terrestris ზრდის დაბალ ტემპერატურულ რეჟიმებში ასინთეზირებს ენდოგლუკანაზების უფრო მრავალფეროვან სპექტრს, რომელთა იზოელექტრული წერტილები მოთავსებულია pI 4,5-დან pI 7,6-მდე, ხოლო 48°-ზე ზრდის პირობებში წყდება ენდოგლუკანაზის სხვადასხვა ფორმების ბიოსინთეზი, რომელთა pI აღემატება 6,4.

კულტურა A Terrestris-ის სიღრმული კულტივირების პირობებში, როდესაც ნახშირბადის წყაროდ ვიყენებდით მკც-ს, კულტივირების გარკვეული დროის შემდეგ (60 სთ) მთლიანად გარდაქმნიდა გლუკოზად (სურ.15,16). ყოველივე ეს შეიძლება აიხსნას იმით, რომ ამ შტამის კულტურალურ სითხეში მოქმედებს მძლავრი ცელულაზური სისტემა. თუ გავითვალისწინებთ იმ გარემოებას, რომ 60 სთ-ის შემდეგაც ენდოგლუკანაზა აქტიურად გროვდებოდა გაკვირვებას იწვევს ის, რომ გლუკოზა წარმოადგენს კარბოჰიდრაზების ბიოსინთეზის კატაბოლიტურ რეპრესორს.

ზემოთ აღნიშნულიდან გამომდინარე მიზანშეწონილად ჩავთვალეთ გვესინჯა კულტურა A.Terrestris-ის გაზრდა სხვა სახის მონო და დი-საქარიდებზე (იოლად მეტაბოლიზირებად სუბსტრატებზე), რომლებიც არ უნდა ყოფილიყვნენ ცელულაზების ბიოსინთეზის რეპრესორები. ნახშირბადის წყაროდ გამოყენებული შაქრებიდან ყველაზე მაღალი აქტივობით ხასიათდებოდა ქსილოზა.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

თუ გავითვალისწინებთ, რომ ნამჯაზე ზრდის დროს კულტურა A.terrestris-ი გვაძლევდა 2-ჯერ უფრო მაღალ ენდოგლუკანაზურ და ქსილანაზურ აქტივობას, ვიდრე მკც-ზე, შესაძლებელია, რომ ნამჯაში არსებული ქსილანის დაშლით მიღებული ქსილოზა ახდენდა გავლენას აქტივობის მომატებაზე. მითუმეტეს, რომ კულტურა გამოყოფს უჯრედგარე აქტიურ და სტაბილურ ქსილანაზური აქტივობის მატარებელ ფერმენტსაც (იხ. ცხრილი 13,14).

ამ მიმართებაში საინტერესოა ის გარემოებაც, რომ, როგორც სურ (17) და ცხრილი 12-დან ჩანს კულტურა A.terrestris-ი ასინთეზირებს განსხვავებული მოლეკულური წონის მქონე ცილას, როდესაც არეში ქსილოზა ემატება 48 საათის კულტივირების შემდგომ. ამ პირობებში ხდება აქტივობის გაორმაგება კულტურალურ სითხეში.

ჩვენი კვლევის ძირითად მიზანს წარმოადგენდა თერმოფილური კულტურა Allesheria terrestris-იდან თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის გამოყოფა. გამომდინარე იქედან რომ ნაცადი მეთოდებით არ მოხერხდა აღნიშნული ფერმენტის ჰომოგენურ მდგომარეობაში მიღება, გამოვიყენეთ მისი თერმომედეგი თვისებები და კულტურალური სითხიდან 65° ტემპერატურაზე ინკუბაციით გამოვლექეთ არათერმომედეგი ცილები. ყოველივე ამის გამო მიზანშეწონილად მიგვაჩნია თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის გაწმენდის მეთოდის დეტალური განხილვა, რამეთუ ის განსხვავდება ცილების გაწმენდის ტრადიციული მეთოდებისაგან.

გამოყოფის პირველ ეტაპად შევარჩიეთ აფინური ქრომატოგრაფია, ე.წ. „Batch" მეთოდი. ფერმენტული პრეპარატი, გახსნილი გამოხდილ წყალში, წინასწარ იყო დამუშავებული 65° ტემპერატურაზე 1,5სთ-ის განმავლობაში. ნალექის მოშორების შემდეგ სუპერნატანტი ემატებოდა ჭიქაში მოთავსებულ მიკროკრისტალურ ცელულოზას და ყოვნდებოდა 18სთ-ის განმავლობაში 4°-ზე. ცილების დესორბცია ხდებოდა ჯერ 0,1M-ის pH 4,5 Na-აცეტატური ბუფერით,

ეროვნული ბიბლიოთეკა

შემდეგ 0,1M-ის pH 7,4 Na-ფოსფატური ბუფერით. ენდოგლუკანაზური აქტივობა მიღებულ იქნა წყლით დესორბციისას. ამ ფრაქციას ვაკონცენტრირებდით როტაციულ ამაორთქლებელზე და შემდგომ ვამოწმებდით 12%-იან SDS-გელ-ელექტროფორეზით (სურ.35). ამ ეტაპზე საგრძნობლად გაიზარდა ფერმენტის ხვედრითი აქტიობა.

გაწმენდის მომდევნო ეტაპს წარმოადგენდა იონცვლადი ქრომატოგრაფია. მატარებლად გამოვიყენეთ DEAE Toyopearl 650M. „Batch" მეთოდით მიღებული კონცენტრირებული ენდოგლუკანაზური ფრაქცია დაგვქონდა იონცვლად სვეტზე. ელუციას ვაწარმოებდით Na-ფოსფატური ბუფერით pH-7,6, გრადიენტით 0-0,2M-მდე და შემდგომ საფეხუროვანი გრადიენტით 1M NaCl-მდე (სურ.36). ფრაქციას, რომელიც ხასიათდებოდა ენდოგლუკანაზური აქტივობით, ულტრაფილტრაციით ვაშორებდით მარილებს. ამ 3 საფეხურის გამოყენებით მოვახერხეთ მიგვეღო ელექტროფორეტიკულად ჰომოგენური ენდოგლუკანაზა (სურ.37). ალბათ ეს მეთოდი მარტივად უნდა ჩაითვალოს, მითუმეტეს რომ ჩვენი ანგარიშით ფერმენტის 60% გაწმენდილ მდგომარეობაში მივიღეთ.

რა თქმა უნდა მაღალ ტემპერატურაზე (65°, 1,5 სთ) დამუშავება არ გამორიცხავს ფერმენტის შესაძლო დენატურაციას. მაგრამ ის გარემოება რომ ამ მეთოდით გაწმენდილ ფერმენტს ძალზედ მაღალი თერმომედეგობა გააჩნია, მეტყველებს იმაზე, რომ მაღალი თერმომედეგი თვისებების მქონე ფერმენტისათვის დენატურაცია არ უნდა მომხდარიყო. ცხრილ № 18-ში წარმოდგენილია ხვედრითი აქტიობის ზრდა ფერმენტის გაწმენდის პროცესში. ხვედრითი აქტიობის ზრდა კიდევ ერთხელ მიუთითებს იმაზე, რომ თუ ადგილი ჰქონდა ფერმენტის დენატურაციას იგი ძალზედ უმნიშვნელოა.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის ხვედრითი აქტიობის ზრდა გაწმენდის პროცესში

ცხრილი №18

შ ტ ა მ ი	საწყისი აქტივობა (nkat/mg)	აქტივობა აფინური ქრ-ის შემდეგ (nkat/mg)	აქტივობა იონცვლ ქრ-ის შემდეგ (nkat/mg)
A.terrestris	14,5	244	500

ვინაიდან ჩვენი კვლევის ერთერთ ძირითად მიზანს წარმოადგენდა თერმოფილური მიცელიალური სოკოების ენდოგლუკანაზების თერმომედეგობის პოტენციალის შეფასება და შესაბამისი პროდუცენტის შერჩევა. ამ ეტაპზე ჩვენ ჩავთვალეთ, რომ ამოცანა მიღწეული იყო. ამგვარი მსჯელობის საფუძვლად შემდეგი არგუმენტები გაგვაჩნია:

- ჩვენს მიერ შერჩეული შტამი A.terrestris-ი მკც-ზე იზრდებოდა 48-49°-ზე, რაც ამ სუბსტრატზე მისი ზრდის მაქსიმალურ ტემპერატურას წარმოადგენდა, მაგრამ იგივე კულტურა კარგად იზრდებოდა 60-62°-ზე ისეთ ადვილად მეტაბოლიზირებად სუბსტრატზე როგორიც არის გლუკოზა, რაც მიუთითებს იმაზე რომ მიცელიალური სოკოების ტემპერატურასთან ადაპტაციის მიხედვით ეს შტამი ექსტრემალური თერმოფილია. ე.ი. ამ შტამის მიერ მაქსიმალურად მაღალი ტემპერატურის კულტივირების პირობებში უნდა მიგვეღო ან ყველაზე თერმომედეგი ან ამ მცნებასთან ძალიან ახლო მყოფი მნიშვნელობის თერმომედეგობა.

- თერმოფილური სოკოების კოლექციიდან სელექციურად შერჩეულია შტამი A.terrestris-ი, რომელიც წარმოქმნის სუპერთერმომედეგ ენდოგლუკანაზას. ეს უკანასკნელი თერმომედეგობით არქებაქტერიების ანალოგიურ ფერმენტებს

ეროვნული ბიბლიოთეკა

თუ შეედრება. აღნიშნული კულტურა წარმოადგენს მოხერხებულ ობიექტს შემდგომი გენეტიკური ინჟინერიის კვლევისათვის. გარდა ამისა თვით ამ კულტურის თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის აქტიობის შემდგომი მატება შეიძლება მოხდეს შტამის ოპტიმალური კულტივირების პირობების დადგენით. A.terrestris-ის ბიომასის ანალიზმა გვიჩვენა რომ იგი შეიცავს 28-30% ცილას და წარმოადგენს კარგ ცილოვან დანამატს ცხოველების კვებაში, ბიომასის გამოკვლევა პათოგენეზზე და ტოქსიურობაზე არ ჩატარებულა.

თუ ცხრილი №16 მოყვანილი მონაცემებიდან გამომდინარე ვიმსჯელებთ, თერმომედეგობის გარდა ფერმენტებს შორის დიდი განსხვავება თვისებებში არ აღენიშნება.

ჩატარებულმა სამუშაომ თვალნათლივ დაგვანახა, რომ კულტურა A. terrestris-ი არის ჩვენს ხელთ არსებულ კოლექციაში თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის საუკეთესო პრდუცენტი.

ფერმენტის გაწმენდის შემდეგ დავადგინეთ, რომ მისი მოლეკულური მასა შეადგენდა 46 000. მოლეკულური მასის ეს მნიშვნელობა შეესაბამება ლიტერატურაში აღწერილ სხვა ენდოგლუკანაზების მოლეკულური მასების სიდიდეებს (67-72).

თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის მიხაელის-მენტენის მუდმივა, რომლის მნიშვნელობაც აღმოჩნდა ტოლი K_m=6,6 გ/ლ, ასევე თავსდებოდა ლიტერატურაში ცნობილი ანალოგიურ მუდმივების დიაპაზონში (1-12 გ/ლ.).

გაწმენდილი ცილის განსაკუთრებულ განმასხვავებელ მახასიათებელს წარმოადგენდა ნახევრადინაქტივაციის დრო ($\tau_{1/2}$) ანუ თერმომედეგობა. თერმომედეგობის ასეთი მაღალი მაჩვენებლით ხასიათდებიან, როგორც წესი მხოლოდ ზოგიერთი თერმოფილური ბაქტერიების და არქებაქტერიების ცელულაზები (149). რაც შეეხება ასკომიცეტებს და ბაზიდიომიცეტებს, 65°-ზე სუბსტრატის გარეშე ნახევრადინაქტივაციის დრო არ აღემატებოდა 20-30 წთ-ს. ამ თვალსაზრისით გამოირჩევა თერმოფილური კულტურა

ეროვნული ბიბლიოთეკა

Chaetomium thermophile, რომლის მიერ სინთეზირებული ენდოგლუკანაზა ხასიათდება თერმომედეგობის შედარებით მაღალი მაჩვენებლით(150).

საინტერესო მონაცემებია მიღებული იმუნური ანალიზის ჩატარების შედეგად. მეზოფილური კულტურა T. reesei-დან გამოყოფილი ენდოგლუკანაზის მიმართ ჩვენს მიერ მიღებულია პოლიკლონალური ანტისხეულები (ერთობლივი სამუშაო ფინეთის ბიოტექნიკურ ცენტრთან) რომლებმაც ცხადყვეს იმუნოჯვარედული რეაქცია A. terrestris-ის მიერ სინთეზირებული სამი ცილის, მათ შორის, ჩვენს მიერ გამოყოფილი თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის მიმართაც (სურ.20). შეიძლება ითქვას, რომ მეზოფილური კულტურა T. reesei-ის ზომიერად თერმომედეგ ენდოგლუკანაზასა და თერმოფილური კულტურა A. terrestris-ის სუპერთერმომედეგ ენდოგლუკანაზებს შორის არსებობს სტრუქტურული (ეპიტოპური) ჰომოლოგია. ის ფაქტი, რომ თერმომედეგ და თერმოლაბილურ ენდოგლუკანაზებს შორის არსებობს იმუნოჯვარედული რეაქცია, გულისხმობს აქტიური ან რომელიმე სხვა ცენტრის იდენტურ სტრუქტურულ და ამინომჟავურ თანმიმდევრობას.

საკმაოდ ინტენსიური მუშაობა მიმდინარეობს დღეს ცილის სტრუქტურის დასადგენად. ამ მიზნებისათვის იყენებენ რენტგენოსტრუქტურული კვლევის შედეგებს, იმუნოქიმიურ ანალიზს, სკანირებად და ელექტრონულ მიკროსკოპიას, კალორიმეტრულ ანალიზს, ამინომჟავური თანმიმდევრობის მონაცემებს, რაც საერთო ჯამში იძლევა საჭირო ინფორმაციას ცილის სტრუქტურის შესახებ.

სამუშაოს მსვლელობისას ჩვენს მიერ ელექტროფორეტიკულად ჰომოგენურ მდგომარეობაში გამოყოფილი იქნა 7 სხვადასხვა სახის ენდოგლუკანაზა, მიცელარული სოკოების სხვადასხვა ჯიშებიდან ამ ფერმენტების კვლევის მონაცემები შეჯამებულია ცხრილი № 16

რა თქმა უნდა ფერმენტების დახასიათება კიდევ ბევრი მაჩვენებლით შეიძლებოდა და ალბათ მიზანშეწონილიც იქნებოდა რომ შეგვესწავლა

ეროვნული ბიბლიოთეკა

ამინომჟავური შემადგენლობა, C- და N- ბოლო ამინომჟავები, ნახშირწყლების ხარისხობრივი შემცველობა და ა.შ. მაგრამ ცხრილში მოყვანილი მონაცემები ჩვენ ჩავთვალეთ საკმარისად მათი ძირითადი განმასხვავებელი თვისებების დასახასიათებლად. ჩვენი მომავალი კვლევის ძირითად ამოცანად ვთვლით ენდოგლუკანაზების მაღალი თერმომედეგობის მიზეზების დადგენას. კვლევას ვაპირებთ გავაგრძელოთ ვეიცმანის ინსტიტუტთან, (ისრაელი) და ჰალამის უნივერსიტეტთან (ინგლისი) მეზოფილური და თერმოფილური მიკროორგანიზმების, (არა მარტო მიცელიალური სოკოების) ენდოგლდუკანაზების და შესაძლოა სხვა თერმომედეგი ფერმენტების გამოყენებითაც.

ჩვენ მიზნად დავისახეთ A.terrestris-ის კულტურიდან გადაგვეტანა გენეტიკური მასალა რომელიმე სხვა უფრო სწრაფად მზარდ კულტურაში. ამისათვის საჭირო იყო ამ კულტურის განმასხვავებელი თვისებების შესწავლა, რისთვისაც ჩვენს მიერ კიდევ ერთი ფერმენტი იქნა მოძიებული და დახასიათებული. ამ მიზნებისათვის ჩვენ შევარჩიეთ კულტურა Aspergillus niger-ი, რომელიც ასინთეზირებს ისეთ ფერმენტს როგორიცაა გლუკოზოოქსიდაზა. აღნიშნული ფერმენტი კვალის სახითაც კი არ სინთეზირდება კულტურა A.terrestris-ის მიერ.

შერჩეული იქნა კულტივირების პირობები, შემდგომ დავამუშავეთ A.niger-ის გლუკოზოოქსიდაზის გასუფთავების მეთოდი, შევისწავლეთ თვისებები და მივედით იმ დასკვნამდე რომ ამ შტამის გლუკოზოოქსიდაზა ძირითადი მაჩვენებლებით არ განსხვავდება ლიტერატურაში აღწერილი მიცელალური სოკოების უჯრედშიგა ანალოგებისაგან (135). საყურადღებოა ის გარემოებაც რომ პრაქტიკულ საქმიანობაში გლუკოზის ანალიზის დროს როგორც მედიცინაში და მრეწვთელობაში ასევე მეცნიერულ კვლევებში უმეტეს შემთხვევაში სწორედ სოკოური წარმოშობის გლუკოზოოქსყიდაზა გამოიყენება საქართველოში. გლუკოზოოქბსიდაზის შესწავლა და მითუმეტეს

ეროვნული ბიბლიოთეკა

მისი პრაქტიკულ გამოყენება არ ჩატარებულა. გამომდინარე იქიდან რომ გლუკოზის რაოდენობრივი შედგენილობა მეტად მნიშვნელოვანი მაჩძვენებელია მედიცინაში და მრეწველობის სხვადასხვა დარგებში ჩვენ გადავწყვიტეთ მიღებულ ფერმენტზე აგვეწყო დიაგნოსტიკუმის მეთოდი.

როგორც მოგახსენეთ ამ კვლევის ერთერთ ძირითად მიზანს წარმოადგენდა პროტოპლასტების შერწყმა. სამუშაოში აღწერილია, რომ თერმოფილური შტამის A.terrestris-ის პარტნიორად შერჩეული იქნა შედარებით სწრაფად მზარდი, უჯრედშიგა გლუკოზოოქსიდაზის პროდუცენტი (სურ.41), მეზოფილური კულტურა A.niger-ი. პროტოპლასტების შერწყმის შედეგად მიღებული იქნა 30-ზე მეტი ექსპერიმენტალური კოლონია. მათი მორფოლოგიური შესწავლის შედეგად შერჩეული იქნა ჯერ ორი ფუზანტი, სპორების წარმოქმნის სიჩქარის თვალსაზრისით და მათი ზომების მიხედვით, ხოლო ამ ფუზანტების მიერ წარმოქმნილი ციღოვანი სპექტრის შესწავლის შემდეგ ავარჩიეთ ერთი, რომელიც ასინთეზირებდა ორივე დედა კულტურის იდენტურ და ასევე მათგან განსხვავებულ ციღებს (სურ.42,43). ფუზანტის მნიშვნელოვან შენაძენს ის წარმოადგენს რომ იგი სწრაფადმზარდია (70-72 სთ) და წარმოქმნის დედა შტამთან A.niger-თან შედარებით ორჯერ მეტი რაოდენობით გრლუკოზოოქსიდაზას. როგორც ამ ფერმენტის შესწავლამ გვიჩვენა იგი არ განსხვავდება დედა შტამის ანალოგისაგან. ფუზანტი ორივე საწყისი კულტურის A.terrestris-ის და A.niger-ის საკვებ არეებზე კარგად იზრდება მხოლოდ A.niger-ის დამახასიათებელ ზრდის ტემპერატურული რეჟიმის პირობებში (30°). A.terrestris-ის საკვებ არეზე კულტივირებისას წარმოქმნის ენდოგლუკანაზას რომელიც იზოელექტრული წერტილით ანალოგიურია ამ კულტურის მიერ სინთეზირებული ენდოგლუკანაზისა (სურ.45). საინტერესოა ის გარემოება რომ თუ A.niger-ის ენდოგლუკანაზა რომელიც მიეკუთვნება ზომიერად თერმომედეგ ციღებს და 65°-ის ინკუბაციის პირობებში

ეროვნული ბიბლიოთეკა

სუბსტრატის გარეშე 5 წუთში კარგავს აქტიობის 50%-ს. ფუზანტის ენდოგლუკანაზა იგივე პირობებში 40 წუთში კარგავს აქტიობის 50%-ს. ეს თერმომედეგობის უდაოდ კარგი მაჩვენებელია მიცელალური სოკოებისათვის. ცხადია A.terrestris-ის სუპერთერმომედეგი ენდოგლუკანაზა გაცილებით უფრო მაღალი თერმომედეგობით ხასიათდება. არ შეიძლება არ აღინიშნოს ის გარემოება რომ ტენდენცია თერმომედეგობის მომატებაზე ფუზანტის მიერ წარმოქმნილ ენდოგლუკანაზის მეზოფილურ A.niger-ის ანალოგიურ ფერმენტთან შედარებით აშკარაა. ალბათ გადამწყვეტი არის კულტივირების ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურის მატება. ჩვენ ვაპირებთ მომავალში ძალზე დაწვრილებით შევისწავლოთ ყველა მიღებული ფუზანტი და პირველ კრიტერიუმად მივიჩნევთ ფუზანტების ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურის მატება.

არ არის გამორიცხული რომ რომელიმე უკვე მიღებული ფუზანტი კიდევ უფრო თერმომედეგ ენდოგლუკანაზას წარმოქმნიდეს. ის რომ ამ ნაშრომში ყველა მიღებული ფუზანტი არ არის დეტალურალდ დახასიათებული, აიხსნება იმით, რომ თვითეული ახალი ფუზანტის დახასიაპთება ძალზედ დიდი რაოდენობის ექსპმიერიმენტალურ სამუშაოსთან არის დაკავშირებული და ამ სამუშაოს მსვლელობაში არ მოხერხდა.

თუ გავითვალისწინებთ იმას რომ, პროტოპლასტების შეოწყმა, ძნელად რეგულირებადი პროცესია ნიშანთვისებების გადაცემის თვალსაზრისით საჭირო ხდება დიდძალი ექსპერიმენტალური კოლონიების მიღება სხვადას ხვა პირობებში სასურველი გენის სრული ექსპრესიის მიზნით. როგორც არ უნდა ვიმსჯელოთ ფაქტი ის არის რომ მიღებულია თერმოფილური და მეზოფილური შტამების პროტოპლასტების შერწყმით ფუზანტი რაც თავდაპირველად სერიოზულ ეჭვებს იწვევდა. ფუზანტი სტაბილური გენეტიკური თვისებებით ხასიათდება და მაღალი გლუკოზოოქსიდაზური აქტიობის გამო დანერგილია მრეწველობაში როგორც გლუკოზოოოქსიდაზის

ეროვნული ბიბლიოთეკა

პროდუცენტი, ხოლო მისგან მიღებული ფერმენტი უკვე გამოიყენება გლუკოზის ანალიზისათვის საქართველოს სხვა და სხვა საავადმყოფოებში.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

დ ა ს კ ვ ნ ე ბ ი

1)მეზოფილურ მიცელალურ სოკოს T.reesei-ის სიღრმულ კულტურაში, ცელულოზის შემცვლელ საკვებ არეზე, ძირითად ენდოგლუკანაზასთან ერთად, პირველად იქნა დადგენილი მინორული, თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის არსებობა, სპეციალურად ამ მიზნისათვის დამუშავებული სვეტური რეაქტორის მეშვეობით. ამ შტამის მიერ წარმიქმნილი ძირითადი ენდოგლუკანაზის ნახევრადინაქტივაციის დრო ($\tau/2$), 65-ის პირობებში, სუბსტრატის გარეშე, შეადგენს 6 წთ, მაშინ როცა, ამავე შტამის მიერ გამოყოფილი მინორული თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის ნახევრადინაქტივაციის დრო, იგივე პირობებში ტოლია 100 წთ.

2)შესწავლილია თერმოფილური სოკოების მაღალი ტემპერატურის მიმართ ადაპტაციის უნარი. თერმოფილური სოკოების კოლექციიდან, ცელულოზის შემცველი საკვებ არეზე, კულტურების მაღალი ტემპერატურული რეჟიმის ზრდის უნარის მიხედვით, შერჩეულია კულტურა A.terrestris-ი, როგორც ყველაზე მაღალ ტემპერატურის პირობებში (48-49°) მზარდი და აქტიური უჯრედგარე, სუპერ-თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის წარმომქმნელი შტამი რომელიც კარგავს თავისი საწყისი აქტივობის 20%-ს 65°-ზე 6 სთ. განმავლობაში.

3) დადგენილია რომ თერმომედეგი ენდოგლუკანაზის ბიოსინთეზის დონე A.terrestris-ის კულტურის მიერ სიღრმულ პირობებში მნიშვნელოვნად არის დამოკიდებული შტამის კულტივირების ტემპერატურულ რეჟიმზე. თუ 30-35°-ის კულტივირების პირობებში ენდოგლუკანაზის თერმომედეგი ფორმა არ წარმოიქმნება, 40°-ის პირობებში კარგად დეტექტირებადია და ახწევს მაქსიმუმს 48-49°-ის პირობებში. უფრო მაღალ ტემპერატურაზე, არეზე სადაც ნახშირბადის წყარო მხოლოდ ცელულოზაა, კულტურის ზრდა არ აღინიშნება, თუმცა სხვა უფრო ადვილად მეტაბოლიზირებად სუბსტრატზე-გლუკოზაზე, კულტურა ინტენსიურად იზრდება 60-62°-ის პირობებშიც.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

4) აფინური ქრომოტოგრაფიის, იონცვლადი ქრომოტოგრაფიის, გელ ფილტრაციის და პრეპარატული ელექტროფორეზის მეთოდების გამოყენებით, ელექტროფორეზულად ჰომოგენურ მდგომარეობაში, მიღებულია შემდეგი მიცელალური სოკოების ენდოგლუკანაზები: T.reesei-დან ძირითადი და მინორული თერმომედეგი, A.terrestris-იდან განსაკუთრებულად თერმომედეგი და Agaricus bisporus-დან ოთხი ენდოგლუკანაზა.

5) შესწავლილია ჩვენს მიერ გამოყოფილი შვიდივე ენდოგლუკანაზის ზოგიერთი ფიზიკო-ქიმიური თვისებები: მოლეკულური მასაიზოელექტრული წერტილი, ნახშირწყლების შემცველობა, ხვედრითი აქტივობა და თერმომედეგობა. როგორც იქნა ნაჩვენები შესწავლილი ენდოგლუკანაზები არ ხასიათდებიან თვისებების დიდი განსხვავებით, თუ მხედველობაში მათ თერმომედეგობას არ მივიღებთ. იმუნოქიმიურმა ანალიზმა გვიჩვენა რომ A.terrestris-ის თერმომედეგ და T.reesei-ს ძირითად ენდოგლუკანაზებს შორის არსებობს იმუნოჯვარედინული რეაქცია, რაც მათ სტრუქტურულ ჰომოლოგიაზე მიუთითებს.

6)Aspergilus-ის, Penicillium-ის და Fusarium-ის ჯიშებს შორის არსებული მიცელიალური სოკოების კოლექციიდან რომელიც მოიცავდა 106 კულტურას შერჩეულია გლუკოზოოქსიდაზის ყველაზე აქტიური პროდუცენტი კულტურა A.niger-ი რომელიც წარმიქმნიდა უჯრედშიგა გლუკოზოოქსიდაზას. დამუშავებულია ფერმენტის გამოყოფის და გასუფთავების მეთოდი რომელიც მოიცავს ექსტრაქციას და იონცვლად ქრომოტოგრაფიას. შესწავლილია გლუკოზოოქსიდაზის ზოგიერთი ფიზიკო ქიმიური მახასიათებლები.

7) თერმოფილური A.terrestris-ის და მეზოფილური A.niger-ის მიცელალური სოკოებიდან დამუშავებულია პროტოპლასტების გამოყოფის მეთოდი. ამ კულტურების პროტოპლასტების შერწყმით მიღებულია ფუზანტი, რომელიც ხასიათდება ორივე მშობლიურ კულტურის თვისებებით და ამავე დროს განსხვავდება მათგან. მიღებული კულტურა ხასიათდება ორჯერ უფრო მაღალი უჯრეთშიგა

ეროვნული ბიბლიოთეკა

გლუკოზოოქსიდაზური აქტივობით ვიდრე, ამ თვისების მატარებელი, დედა შტამი A.niger-ი. ფუზანტი წარმოქმნის უკრედგარეშე ენდოგლუკანაზას, რომელიც ელექტროფორეზულად ანალოგიურია A.terrestris-ის ენდოგლუკანაზისა, მასზე ნაკლებად თერმომედეგია, სამაგიეროდ ამ მაჩვენებლით, მნიშვნელოვნად სჭარბობს A.niger-ის ენდოგლუკანაზას. ფუზანტის დამახასიეთებელი ნიშანთვისებები გენეტიკურად სტაბილურია, რის გამოც შტამი სამრეწველო მასშტაბით გამოიყენება გლუკოზოოქსიდაზის მისაღებად.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

გამოყენებული დიცენრატურა

1. Enari T.M., Niku-Paavola M.L., (1987). Enzymatic hydrolysis of cellulose: is our current theory of mechanism of hydrolysis valid. - CRC Crit. Rev. in Biotechnology. 5, 67-87.
2. Marsden W.L., Gray P.P. (1985). Enzymatic hydrolysis of cellulose in lignocellulosic materials. - CRC Crit. Rev. Biotechnol. 3, 235-276.
3. Дж.Бейли, Д.Оллис (1989). Основы биохимической инженерии. - Москва, "Мир", 215-227.
4. Eriksson K.E. (1981). Cellulases of fungi. - Trends Biol. Ferment. Fuels. Chem. 18, 19-32.
5. Кутузова Г.Д., Угарова Н.Н., Березин И.В. (1982). Взаимосвязь между структурей и стабилностью белков и ферментов из мезофильных и термофильных источников.-Биоорган. химия, 8, 1445-1461.
6. Кутузова Г.Д., Угарова Н.Н., Березин И.В. (1984). Общие закономерности изменения термостабильности белков и ферментов после химической модификации их функциональных групп.-Успехи химии, т.53, 1852-1890.
7. Шульц Г., Ширмер Р. (1982).Принцип структурной организации белков. М. Мир, 352-354.
8. Singleton R., Middaugh C.R., MacElroy J. (1977). Comparison of proteins from thermophilic and nonthermophilic sources in terms of structural parameters. -J. Peptide and Protein Res., 10, 39-51.

9. Perutz M.F. Electrostatic effects in proteins.(1978).-Science, 201, 1187-1192.

10. Березин И.В., Можаев В.В. (1985). Взаимосвязь структуры и стабильности белков. Новые подходы к стабилизации ферментов. -Успехи биоорг.химии, 24, 108-124.

11. Квеситадзе Г.И. - 1990. Ферменты микроорганизмов, живущих в экстремальных условиях. 42-е Баховские чтения. Изд. "Наука", М. 52стр.

12. Boccu E., Veronese F.M., Fontana A. (1976). In:"Enzymes and Proteins from thermophilic microorganisms". (Ed.H.Zuber), Basel: Birkhauser Verl., 229-236.

13. Кутузова Г.Д., Угарова Н.Н. (1981). Стабилизация пероксидазы хрена при ацетилировании фермепта в присутствии ионов Ca^{2+}. -Биоорган.хим., т. 7, 75-86.

14. Квеситадзе Г.И., Сванидзе Р.С., Буачидзе Т.Ш., Бендианишвили М.В. (1978). Кислотостабильная и кислотолабильная α-амилазы плесневых грибов рода Aspergillus . -Биохимия, 9, 1688-1694.

15. Ohta Y. (1967). Thermostable proteases from thermophilic bacteria. -J. Biol. Chem., 242, 509-515.

16. Fontana A., Boccu E., Veronese F.M. (1976). In:"Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganisms". (Ed.H.Zuber), Basel Birkhauser Verl., 375-389.

17. Fontana A., Boccu R., Veronese F.M. (1976). In:"Enzymes and Proteins from Thermophilic Mikroorganisms". (Ed.H.Zuber), Basel, Birkhauser, Verl., 55-59.

18. Singleton R. (1973). Protein from Thermophilic microorganisms. -,Bacteriol. Rev., 37, 320-342.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

19. Merkler D.J., Farrington G.K., Wedler F.C. (1981). Correlation between calculated macroscopic parameters and mezophilic bacilii. -J. Peptide and Protein Res., 18, 430-443.

20. Wedler F.G., Hoffman F.M., Kenney R., Carfi G. (1976). In:"Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganisms" (Ed. H. Zuber), Basel, Birkhauser Verl., 187-197.

21. Ogasahara K., Imanishi A., Isemura I. (1970). Studies on thermophilic a-amilases from Bacillus stearothermophilus. -J. Biochem., 67,65-67.

22. Jaenicke R. (1981). Enzymes under extremes of physical conditions. -Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10,1-67.

23. Mojima H., Ikai A., Noda H., Hon-Nami K., Oshima T. (1978). Thermodynamic studies on reversible denaturation of thermostable proteins from an extreme thermophiles. In: "Biochemistry of ThermophilY". (Ed. Friedman P.). Academic Press, New York, 305-323.

24. Boccu E., Veronese F.M., Fontana A. (1976) Enzimes and proteins from thermophilic microorganizms /Ed. Zuber, Basel: Birkhauser Ver., 229-236.

25. Привалов П.Л. (1985). Енергетика структуры белковых молекул. -Биофизика, 30, 722-733.

26. Привалов П.Л. (1987). Стабильность белка и гидрофобные взаимодействия.-Биофизика, 32, 742-760.

27. Fontana A. (1986). In: "Biocemistry, genetics and technology of extremophilic microorganisms". Padua, Italy, UNIDO-Trieste, 265.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

28. Ulbrich R. (1988). Vergleich der chemischen und thermischen Stabilität von loslichen und immobilisierten α-Amylases aus B.lichemiformis und A.oryzae.-Biomed.Biochim.Acta, 47, 812-830.

29. Mozhaev V.V., Martinen K. (1984). Structure-stability relationship in proteins:new approaches to stabilizing enzymes. -Enzyme Microb. Technol., 6, 50-58.

30. Tanford C. (1968). The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes. New York, J.Wiley and Sons, 310.

31. Nazaki Y., Tanford C. (1963). The stability of amino acids, diglycine and triglicine in aqueos guanidine hydrochloride solutions. -J.Biol.Chem., 238, 4074-4081.

32. Barnes L.D., Steeewagen E, (1973). Enolase from the thermophile thermys X-1. -Biochemistry, 12, 1559-1565.

33. Singleton R., Kimmel J.R., Amelunxen R.E. (1969). The amino acid composition and other properties of thermostable glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from Bacillus stearothermophilus. -J. Biol. Chem., 244, 1623-1630.

34. Saha B.C., Mathupala S.P., Zeikus J.C. (1988). Purification and characterization of a higly thermostable novel pullulanase from Clostridium thermohydrosulfuricum. -Biochem. J., 252, 343-348.

35. Мартинек К., Левашов А.В., Березин И.В. (1970). Гидрофобное взаимодействие алифатических спиртов с активным центром α-химотрипсина. -Молекул.биол., 4, 517-523.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

36. Dallman B., Kuehn L., Grziwa A., Zwickl P. (1992). Biochemical properties of the proteasome from Thermoplasma acidophilum. - Eur. J. Biochem. 208 (3), 789-797.

37. Wadler F.C., Hoffman F.M., Kenney R., Carfi J. (1976). In: "Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganisms". (Ed. H.Zuber), Basel, Birkhauser, Verlag, 187-197.

38. Heinen W., Lauwers A.M. (1976). In: "Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganisms". (Ed.H.Zuber), Basel, Birkhause, Verlag, 77-89.

39. Oshima T. (1978). Properties of heat stable enzymes of extreme thermophiles. -Enzyme Engineering, (Eds.G. Brown, L.Wingard), v.4, 41-46.

40. Клёсов А.А. (1983). Ферментативное превращение целлюлозы. В сборнике: "Итоги науки и техники", сер. Биотехнология, том 1, 63-141.

41. Клёсов А.А., Рабинович М.Л. (1980). В сб. Превращение древесины при микробиологическом и энзиматическом воздействиях. Рига, "Зинатне", 8-15.

42. Клёсов А.А., Рабинович М.Л., Синыцин А.Г., Гурилова И.В., Григораш С.Н. (1980). Ферментативный гидролиз целлюлазы I. Активность и компонентный состав целлюлазного комплекса из различных источников. -Биоорган. химия, 6, 1225-1242.

43. Рабинович М.Л., Черноглазов В.М., Клёсов А.А. (1983). Изоферменты эндоглюканазы в целлюлозных комплексах :различное сродство к целлюлозе и неодинаковая роль в гидролизе нерастворимого субстрата. -Биохимия, 48,369-378.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

44. Родионова Н.А. (1981). Ферментативное расщепление целлюлозы. -Наука, Москва, 4-40.

45. Синицын А.П. Клесов А.А. (1981). Сравнительная роль экзо-1,4-β-глюкозидазы и целлобиазы при ферментативном гидролизе целлюлозы. -Биохимия, 46, 202-213.

46. Streamer M., Eriksson K.E., Petterson B. (1975). Extracellulase enzymes system utilized by fungus Sporotrichum pulverulentum for the breakdown of cellulose functional characterization of five endo-1,4-β-glucanases. -Eur. J. Biochem., 59, 607-613.

47. Рабинович М.Л., Клесов А.А., Березин И.В. (1979). Механизм образования глюкозы при ферментативном гидролизе целлюлозы: сравнительная роль экзо-1,4-β-глюкозидазы и целлобиазы. -ДАН СССР, 246, 500-504.

48. Enari T.M., Niku-Paavola M.L. (1987). Enzymatic hudrolysis of cellulose: is the current theory of mechanism of hydrolysis valid? - Grit. Rev. Biotechnol., 5, 67-87.

49. Coninek-Chosson J. (1988). Aerobic degradaton of cellulose and adsorbtion proteins of cellulases in Cellulomonas Uda JC3: effect of crystallinity of substrate. -Biotechnol. Bioeng., 34, 495-501.

50. Patchett M.L., Daniel R.M., Morgan H.W. (1987). Purification and properties of a stable β-glucosidase from an extremely thermophilic anaerobic bachterium. -Biochem. J., 243, 779-787.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

51. Joliff G., Beguin P., Juy M., Millet J., Ryter A., Polyak R., Aubert J.P. (1986). Isolation, crystallization and properties of a new cellulose of Clostridium thermocellum overproduced in Escherichia coli. - Biotechnology, 4, 896-900.

52. Weimer P.J., Weston W.M. (1985). Relationship between the fine structure of native cellulase complexes of Trichoderma reesei and Clostridium thermocellum. -Biotechnol. Bioeng., 27,1540-1547.

53. Yiu F., Toda K. (1988). Isolation of new anaerobic, thermophilic and cellulolitic baecteria IT strains and their cellulase production. -J.Ferment. Technol., 4, 389-395.

54. Linko M. (1977) An evalution of enzymatic hydrolysis of cellulosic materials. Adv. Biochem., Eng. 5,26-47.

55. Рабинович М.Л. (1988). Целлюлазы термофильных анаеробов.- Итоги Науки и Техники ВИНИТИ. Биотехнол., 10,207-219.

56. Билай Т.И. (1978) Термостабильные ферменты грибов. Наукова Думка, Киев, 245.

57. Kvesitadze G., Gogilaschvili L., Svanidze R., Buachidze T., Chirgadze L., Nizharadze D. (1986). Exogenous cellulases of thermophilic micromycetes. II. Thermostability of enzymes preparations. - Acta Biotechnol., 3, 361-367.

58. Гогилашвили Л.З., Шаламберидзе М.Д., Урушадзе Т.Р., Хведелидзе Р.М., Сванидзе Р.С., Квеситадзе Г.И. (1988). Физико-химические свойства эндоглюканаз термофильных микромицетов.-Биотехнология 4, 450-456.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

59. Kvesitadze G.I., Kvachadze L., Aleksidze T. (1986). Exogenous cellulases of thermophilic micromycetes. I.Selection of producers. -Acta Biotechnol., 6, 101-106.

60. Kvachadze L., Kvesitadze G., Khocholava R. (1985). Isolation and Characterization of cellulasse preparations of thermophilic fungi. - VTT Symposium 60. Monitoring and control of plant raw material bioconversion. Technological Aspects.Espoo, 156-165.

61. Квеситадзе Г.И., Квачадзе Л.Л., Алексидзе Т.И., Логинова Л.Г., Иванова И.И.,Гужова Е.П. (1986). Штамм Aspergilus terreus АТ-490- продуцент целлюлаз. -Авторское свидетельство N1252336.

62. Rodionova N.A., Tavobilov I.S.,Martinovich L.I.,Buachidze T., Bezborodov A.M., Kvesitadze G.I. (1987). β-Glucosidase from cellulolitic fungi Aspergilus terreus, Geotrichum candidum and Trichoderma longibrachiatum as typical glicosidases. -Biotechnol. and Appl. Biochem., 9, 239-250.

63. Квачадзе Л.Л., Квеситадзе Г.И., Клёсов А.А., Нуцубидзе Н.Н., Рабинович М.Л., Сихарулидзе Н.Ш., Черноглазов Б.М. (1988). Биоконверсия целлюлозы: микробиология и биохимия. В сб.:"Итоги науки и техники ВИНИТИ. "Биотехнология", II, I-224.

64. Шаламберидзе М.Д. (1989). Эндо-1,4-β-глюканаза термофильного микромицета Chaetomium thermophile. Автореферат кандидадтской диссертаций. Тбилиси.

65. Шаламберидзе М.Д., Гогилашвили Л.З., Квеситадзе Г.И. (1988). Выделение и свойство высокоочищенной эндо-1,4-β-глюканазы Chaetomium thermophile. ДАН СССР, т.300, 5, 1248-1251.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

66. Klyosov A.A., Ermolova O.V., Chernoglazov V.M. (1988). Thermostable endo-1,4-β-glucanase from Myceliophtora thermophile. - Biotechnol. Lett., 10, 351-354.

67. Berghem L.E.R., Pettersson L.G., Axio-Fredriksson U.B. (1976). The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Purification and some properties of two different 1,4-β-glucanohydrolases from Trichoderma viride. -Eur. J. Biochem., 61, 621-630.

68. Shoemaker S.D., Brown Jr.R.D. (1978). Enzymatic activities of endo-1,4-β-glucanases purification from Trichoderma viride. -Biochem. Biophys. Acta., 523, 133-146.

69. Hakansson U., Fagerstam L., Pettersson L.G., Andersson A. (1979). A 1,4-β-glucan glucanohydrolase from the cellulolytic fungus Trichoderma viride QM 9414. - Biochem. J., 179, 141-149.

70. Gong C.S., Ladisch M.R., Tsao G.T. (1979). Biosynthesis, purification and mode of action of cellulases of Trichoderma reesei. - Adv. Chem. Ser., 181, 261-287.

72. Havansson V., Fagerstam L., Pettersson L.G., Andersson L. (1979). A 1,4-β-glucan glucohydrolase from the cellulolitic fungus Trichoderma Viride QM 9414. - Biochem. J., 179, 141-149.

73. Lappalainen A. (1988). Cellulolytic and xylanolitic enzymes of Trichoderma reesei. - Academic Dissertation VTT, Publications 50, Espoo 1-54.

74. Gum E.K., Brown R.D. (1976). Structural Characterization of a glucoprotein cellulase 1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase C from Trichoderma viride. - Biochem. Biophys. Acta, 446, 371-386.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

75. Gum E.K., Brown R.D. (1977). Comparison of four purified extracellular 1,4-β-D-glucan cellobiohydralase enzymes from Trichoderma viride, -Biochem. Biopys. Acta, 492, 225-231.

76. Gritzali M., Brown R.D. (1979). The cellulase system of Trichoderma. The relationship between purified extracellular enzymes from induced or cellulose-grown cells. - Adv. Chem. Ser., 181, 237-260.

77. Berghem L.E.R., Pettersson L.G., (1973). The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Purification of cellulolytic enzyme from Trichoderma viride active on highly ordered cellulose. - Eur. J. Biochem., 37, 21-30.

78. Fagerstam L.G., Pettersson L.G. (1979). The cellulolytic complex of Trichoderma Reesei QM 9414. - An Immunochemical Approach. - FEBS Lett., 98, 363-367.

79. Fagerstam L.G., Pettersson L.G. (1980). The 1,4-β-glucan cellobiohydrolases of Trichoderma reesei QM 9414.A new type of cellulolytic synergism. - FEBS Lett., 119, 97-100.

80. Berghem L.E.R., Pettersson G., Akio-Fredriksson U.B. (1975). The mechanism of enzymatic cellulose degradation. characterization and enzymatic properties of a 1,4-β-glucan cellobiohydrolase from Trichoderma reesei. - Eur. J. Biochem., 53, 55-62.

81. Tielbeurgh H., Bhikhabhai R., Pettersson G., Claeyssens M. (1984). Separation of endo- and exo-type cellulases using a new affinity chromatography method. - FEBS Lett., 169, 215-218.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

82. Berghem L.E.R., Pettersson G. (1974). The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Isolation and some properties of a β-glucosidase from Trichoderma viride.- Eur. J. Biochem., 46, 295-305.

83. Bong C.S., Ladish M.R., Tsao G.T. (1977). Cellobiase from Trichoderma viride: purification, properties, kinetic and mechanism. - Biotechnol. Bioeng., 26, 296-300.

84. Inglin M., Einberg B. A., Loewenberg J.R. (1980). Partial purification and characterization of a new intracellular β-glucosidase of Trichoderma reesei. - Biochem. J., 185, 515-519.

85. Chirico W.J., Brown R.D. (1987). Purification and characterization of a β-glucosidase from Trichoderma reesei. - Eur. J. Biochem., 165, 333-341.

86. Schmid G., Wandrey C. (1987). Purification and partial characterization of a cellulodextrin glucohydrolase (β-glucosidase) from Trichoderma reesei strain QM 9414. - Biotechnol. Bioeng., 30, 571-585.

87. Sharrock K.R., Sisson C.H., Daniel R.M., Morgan H.W. (1983). Cellulases from extremely thermophilic bacteria.-Chemistry in New Zeland, 3, 62-64.

88. Creuzet N., Frixon C. (1983). Purification and characterization of an endoglucanase from a newly isolated thermophilic anaerobic bacterium. - Biochemie, 65, 149-156.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

89. Durand H., Soucaille P., Tiraby G. (1984). Comparative study of cellulases and hemicellulases from four fungi mezophiles Trichoderma reesei and Penicillium sp. and thermophiles Thielavia terrestris and Sporotrichum cellulophilum. - Enzyme Microb. Technol., 4, 75-180.

90. Moloney A.P., McCrae S.J., Wood T.M., Coughlan M.P. (1985). Isolation and characterization of the 1,4-β-D-glucan glucanohydrolases of Talaromyces emersonii. - Biochem. J., 225, 365-374.

91. McHale A., Coughlan M.P. (1981). The cellulolytic system of T.Emersonii. - Biochim. Biophys. Acta, 66, 152-159.

92. Macris B.J. (1984). Production and characterization of cellulasa and β-glucosidase from a mutant of Alternaria alternata. - Applied and Environ. Microbiol., 3, 560-565.

93. Hayashida S., Yoshioka H. (1980). Production and purification of thermostable cellulases from Humicola insolens YH-8. - Agr. Biol. Chem., 44, 8, 1721-1728.

94. Sen S., Abraham T.K., Chakrabarty S.L. (1982). Characterization of the cellulase produced by Myceliophthora thermophile D-14. - Can. J. Microbiol., 28, 83, 271-277.

95. Tong G.C., Cole A.L., Shepherd M.G. (1980). Purification and properties of the cellulases from the thermophilic fungus Thermosscus aurantiacus. - Biochem. J., 191, 1, 83-94.

96. Margaritis A., Merchant E. (1984). Production and thermalstability characteristics of cellulase and xylanase. Enzymes from Thielavia terrestris. - Biotechnol. and Bioeng. Symp., 13, 299-314.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

97. Blukhabhai T., Johansson G., Petterson G. (1984). Isolation of cellulolitic enzymes from Trichoderma reesei QM 9414.-J.Appl. Biochem., 6, 336-345.

98. Bhikhabhai R., Pettersson K.G. (1984). The cellylolytic enzymes of Trichoderma reesei as a system of homologous proteins. Cyanogen bromid peptides and partial sequence of endoglucanase II. -FEBS Lett., 167,301-308.

99. Henrissat B., Driguez H., Viet C., Schulein V. (1985). Synergism of cellulases from Trichoderma reesei in the degradation of cellulose. - Biotechnology, 3, 722-726.

100. Salaheimo M., Lethovaara P., Pentilla M., Teeri T., Stahlberg J., Johansson G., Petterson G., Knowles J. (1988). EGIII, a new endoglucanase from Trichoderma reesei: the characterization of both gene and enzyme. - Gene, 63, 11-21.

101. Клёсов А.А., Ермолова О.В., Черноглазов В.М., Логинова Л.Г., Гужова Е.П. (1987). Термостабильная 1,4-β-Д-эндоглюканаза из Myceliophtora thermophile: очистка и характеристики. - Прикл. биохиь. микробиол., 23, 44-49.

102. Cantarella M., Gallifuoco A., Scardi V., Alfani F. (1984). Enzyme stability and glucose inhibition in cellulose saccharification. - Ann. New York Acad. Sci., 434,39-43.

103. Saddler J.N., Hogan C.M., Louis-Seize G. (1985). A comparison between the cellulase systems of Trichoderma harzianum E58 and Trichoderma reerei C30. - Appl. Microbiol. Biotechnol., 22, 139-145.

104. Nisizawa K. (1973). Mode of action of cellulases.-J. Ferment. Technol., 51, 267-304.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

105. Васильева Н.В. (1987). Эндо-1,4-β-глюканаза из Geotrichum candidum 3c. - Современные проблемы биотехнологии микроорганизмов. Рига. Тезисы докладов, 13.

106. Sadana J.C., Lachke A.H., Patil R.V. (1984). Endo-(1,4)-β-D-glucanase from Sclerotum rolfsii. Purification,substrate specificity and mode of action. - Carbohydr. Res., 133, 297-312.

107. Нуцубидзе Н.Н., Клесов А.А., Тодоров П.Т. (1985). Кинетика и механизм ингибирования целлюлаз из различных источников продуктами ферментативного гидролиза целлюлозы. - Биотехнология, 6, 69-76.

108. Creuzet N., Frixon C. (1983). Purification and characterization of endoglucanase from newly isolated Thermophilic anaerobic bacterium. - Biochemie, 65, 149-156.

109. Paice M.G., Desrochers M., Rho D., Jarusek L., Roy C., Rollin C.F., Miguel E., Yaguchi M. (1984). Two forms of endoglucanases from the basidiomycete Shizophyllum hydrolases. - Biotechnol., 2, 535-539.

110. Nakayama M., Tomita T., Suzuki H., Nisasawa K. (1976). Partial prteolises of some cellulase components from Trichoderma viride and the substrate specificity of the modified products. - J. Biochem., 5, 955-966.

111. Whitaker D.R. (1971). The Enzymes (Ed. Boyer P.D.). Academic Press, New York, 1, 273-290.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

112. Eriksson K.E., Petterson B. (1982). Purification and partial characterization of two acidic proteases from the white-rot fungus Sporotrichum pulverulentum. - Eur. J. Biochem., 124, 635-642.

113. Нижарадзе Д.Н. (1989). Кинетика и механизм термоинактивации β-глюкозидазы термофильной культуры Aspergillus wentii. - Автореферат кандидатской диссертации. Тбилиси.

114. Zuber H. (1979). In: "Stragedies of Microbial Life in Extreme Environments". Weinheim/New York, Springer,

115. A Kyriacou, C.Roger MacKenzie, R.J.Neufeld (1987). Detection and characterization of the specific and nonspecific endoglucanases of Tr.reesei:evidence demonstrating endoglucanase activity by cellobiohydrolase II. - Enzyme Microb. Technol., v 9, 25-32.

116. M.Theberge, P.Lacaze, F.Shareck, R.Morosoli, D.Kluepfel (1992). Purification and characterization of an endoglucanase from Streptomyces lividans 66 and DNA sequence of the gene. -Applied and Environmental Microbiology, v 58, 815-820.

117. Kvesitadze E.G., Lomitashvili T.V., Kvesitadze G.I. and Niku-Paavola M-L. (1992). Thermostable endoglucanases of the thermophilic fungus Allesheria terrestris. - Biotechnol. Appl. Biochem., 16, 303-307.

118. Kristjansson J.K. (1989). Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes. - Tibtech-december, v 7, 349-353.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

119. Moser B.,Gilkes N.R.,Kilburn D.G.,Warren R.A.J.,Miller R.C., (1989). Purification and characterization of endoglucanase C of Cellulomonas fimi, cloning of the gene and analysis of in vivo transcripts of the gene. - Applied and Environmental Microbiology, oct, v 55, 2480-2487.

120. Gritzal M., Brown R.D. Jr. The cellulase system of Trichoderma Adv. Chem. Ser. 181, 237-260.

121. Thomas M.Wood and Sheila I. McCrae (1978). - The cellulase of Trichoderma Koningii. - Biochem. 171, 61-72.

122. Poonam Nigam and K.A.Prabhu (1988). Thermal activation and stability of cellulases derived from two basidiomycetes.- -Biotechnology Letters, v.12, 919-920.

123. Knowles J., Lehtovaara P. and Teeri T. (1987). Cellulase families and their genes. - Reprinted from Trends in Biotechnology, september, v 5, 255-261.

124. Родионова Н.А., Тиунова Н.А., Фениксова Р.Ф., Тимохин И.М., Фильkенштейн Р.В., Мартинович Л.И. (1966). Методы определения целлюлолитической активности. - Прикл. биохим.микробиол. 2, 197-205.

125. Bailey M.J., Nevalainen K.M.H. (1981). Induction isolation and testing of stable Trichoderma reesei mutants with impoved production of solubilizing cellulase". - Enzyme Microb. Technol. 3, 153-157.

126. Somogyi M. (1952). Determination of reducing sugars.- J.Biol. Chem., 195, 19-28.

127. Nelson N.A. (1944). Photometric adaptation of the somogi method for the determination of glucose. - J.Biol. Chem., 153- 357.

128. Bradford M.M. (1974). A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the priple of protein-dye binding. - Anal. Biochem., 59, 277-282.

129. Квеситадзе Э.Г., Ломиташвили Т.В. (1989). Минорный термостабильный компонент Trichoderma reesei. - Известия Акад. наук ГССР, серия Биологическая, 3, 188-193.

130. Остерман Л.А. (1981). Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. - - "Наука" Москва, 56-64.

131. Остерман Л.А. (1983). Исследование биологических макромолекул электрофокусированием и имуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. - "Наука", Москва, 20-42.

132. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.

133. Beguin P. (1983). Detection of cellulase activity in gels usings Congo Red-stained agar replicas. - Anal.Biochem., 131, 333-336

134. В.М.Фогерти (1986). Микробные ферменты и биотехнология. - Москва, "Агропромиздат", 98-100.

135. Swoboda B.E., Massey V. (1965). Purification and prorerties of the glucose oxidase from Aspergillus niger. - J. Biol. Chem., 240, N.5, 2209-2215.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

136. Квеситадзе Э.Г.,Адейшвили Е.Т., Гогодзе Л.М. (1994). Слияние протопластов термофильной культуры Allesheria terrestris и мезофильной культуры Aspergillus niger. - Прикл. Биохим. Микробиол. В печати.

137. Шаламберидзе М.Д. (1989). Эндо-1,4-β-глюканаза термофильного микромицета Chaetomium thermophile. Автореферат кандидатской диссертации. Тбилиси.

138. Квачадзе Л.Л. (1992). Экстремофильные микроскопические грибы: селекция продуцентов, выделение и характеристика амилаз, целлюлаз и протеазы. Автореферат докторской диссертации. Тбилиси.

139. Квеситадзе Е.Г., Адейшвили Е.Т., Ткешелашвили Р.Ш. (1994). Факторы, влияющие на биосинтез термостабильных эндоглюканаз и ксиланаз в культуре гриба Allesheria terrestris. - Прикл. биохим. микробиол. 30, 101-105.

140. Закордонец Л.А., Супрун С.М., Пустовалова Л.И. (1989). Использование фузариев для обогащения кормов. - Биотехнология. 5, 93-97.

141. Brown J.A., Collin S., Wood T. (1987). Enhanced enzyme production by the cellulolytic fungus Penicillium pinophilum, mutant strain NTG III/6.-Enzyme Microb. Technol., vol.9, 176-180.

142. Park S., Pack M. (1986). Cloning and expression of bacillus cellulase gene in Escherichia coli. - Enzyme Microb. Technol. 8, 725-728.

ეროვნული ბიბლიოთეკა

143. Knowles J., Lehtovaara P., Teeri T., Penttila M., Salovuori I., Andre L. (1987) The application of recombinant - DNA technology to cellulases and lignocellulosic wastes. Phil. Trans. R. Soc. Lond. A321, 449-454.

144. Poutanen K. (1988). Characterization of xylanolytic enzymes for potential applications. - VTT ESPOO 1988. 19-20.

145. Klysov A. (1988). Cellulases of the third generation - -FEMS Symposium NO.43, "Biochemistry and Genetics of Cellulo- se Degradation", 87-99.

146. Margaritis A., Merchant R.FJ. (1986). Thermostable cellulases from thermophilic micro-organisms. - CRC Crit. Rev. Biotechnol. 4, 327-366.

147. Кретович В.Л. (1986). Биохимия растений. - Москва, "Высшая школа", 433-450.

148. Билай В.И. (1989). Основы общей микологии.-Киев "Выща школа" 64-132.

149. Fauth U., Romaniec M., Kobayashi T., Demain A.L. (1991). Purification and characterization of endoglucanase S_s from Clostridium thermocellum. - Biochem.J., v.279, 67-73.

150. Логинова Л.Г. (1988). Термостабильные целлюлазы и термофильные микроорганизмы. - Биотехнология. 10, 73-74.

ეროვნული
ბიბლიოთეკა