

**ИНДУКЦИЯ КСИЛАЗЫ
У ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ****И.Д.АХМЕДОВА, Х.Г.ГАНБАРОВ**

*Исследована индукция синтеза ксиланазы у грибов *B. adusta*, *C. pubescens* и *F. pinicola*. Показано, что оптимальной концентрацией индукторов ксиланазы у *F. pinicola* 47 являлось: Na-КМЦ – 0.2%, ФБ – 0.3%; у *B. adusta* 40 – Na-КМЦ – 0.4%; у *C. pubescens* 82- целлобиоза – 2,5 мМ. Оптимальное количество мицелия для трех штаммов оказалось 4,2 мг/мл. Синтез ксиланазы зависит также от кислотности среды.*

Относительно регуляции биосинтеза ксиланолитических ферментов базидиальных грибов имеется немного сведений. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что ксиланазы грибов в основном являются индуцибельными ферментами, а их истинные индукторы - чаще всего продукты гидролиза нерастворимых субстратов (1-5).

В понимании механизмов регуляции синтеза ксиланазы у грибов ключевая роль отводится первичным реакциям клетки в ответ на добавление различных сахаров. Механизм индукции ксиланазы у грибов изучен лишь в общих чертах. Индукторы этих ферментов – продукты гидролиза полисахаридов, входящих в состав стенки растительной клетки. Впервые это было показано на примере гриба из рода *Trichoderma*, у которого синтез ксиланаз индуцировался добавлением сафарозы (10).

Ранее нами было показано, что биосинтетическую продуктивность дереворазрушающих базидиальных грибов можно повышать созданием оптимальных условий, благоприятных как для роста, так и для биосинтеза фермента, и в качестве активных продуцентов ксиланазы отобраны грибы *Bjerkandera adusta* 40, *Coriolus pubescens* 82, *Fomitopsis pinicola* 47 (4). Поскольку было показано, что наибольший синтез ксиланаз наблюдался у гриба *B. adusta* 40 при использовании Na-КМЦ; у *C. pubescens* 82 – целлобиозы и у *F. pinicola* 47 – ФБ (1), то дальнейшие опыты проводили с этими индукторами

Настоящая работа посвящена изучению индукции ксиланазы у отобранных дереворазрушающих базидиальных грибов.

Материалы и методы исследования

В качестве продуцентов ксиланазы были использованы мицелиальные культуры базидиальных грибов: *Vjerkandera adusta* 40, *Coriolus pubescens* 82, *Fomitopsis pinicola* 47, взятые из коллекции культур Института Микробиологии НАН Азербайджана.

Активность ксиланазы определяли по методу Санду и Калра (Sandhiu, Kalra) (9). Активность выражали в миллимолях продукта (ксилозы) реакции, образованного 1 мг белка за 1 мин (ед мг^{-1} белка).

Содержание белка определяли спектрофотометрически (11).

Индукцию синтеза ксиланаз проводили в системе острых опытов на среде без азота. Для проведения острых опытов мицелий гриба выращивали в жидкой среде (3) в течение 48 часов. Биомассу промывали стерильной дистиллированной водой 3 раза. Суспензии клеток готовили в 0.1 М фосфатном буфере pH 6.0 (концентрация 2 – 4 мг/мл по сухому весу) объемом 10 – 20 мл. 10 мл фосфатного буфера добавляли в колбу Эрленмейера на 50 – 100 мл с индуктором и инкубировали в течение 18 – 24 ч при 28 – 30⁰ С на качалке. В качестве контрольного варианта использовали клетки в буфере без индуктора. По окончании опыта биомассу отделяли от среды фильтрованием. Мицелий отмывали от адсорбированных ферментов дистиллированной водой.

Внеклеточную активность измеряли в культуральных фильтратах, а связанную с клеткой активность – в бесклеточных экстрактах, которые получали путем измельчения промытой буферным раствором биомассы на микроизмельчителе тканей РТ – 2 (3 раза по 3 мин. с охлаждением). Измельченную биомассу центрифугировали при 800 об/мин 20 мин и использовали надосадочную жидкость.

Вес сухого мицелия определяли после высушивания при 105 °С в течение 24 часов.

В качестве индуктора использовали следующие субстраты: целлюлоза (ФБ) (0,5%), натрийкарбоксиметилцеллюлоза (Na-КМЦ) (0,2%), целлобиоза (2,5 мМ).

Все опыты поставлены в 5 – 6 повторностях и полученные результаты подверглись статистической обработке с оценкой достоверности по Лакину (7). Достоверными считались различия при $P < 0,05$, на грани достоверности – $P < 0,1$ и $P = 0,05$.

Результаты и обсуждение

Было изучено влияние концентрации Na-КМЦ, ФБ, целлобиозы, количества биомассы и pH среды на индукцию ксиланазы.

Концентрация Na – КМЦ, ФБ в опытах варьировала от 0.05 до 1% и целлобиозы от 0.5 до 5 мМ, соответственно, а количество мицелия – от 1.2 – до 6 мг/мл. Индуцирующий эффект увеличивался с повышением концентрации индукторов до определенного значения, выше которого наблюдалось уменьшение ксиланазной активности (рис.1). Это явление можно

объяснить тем, что эти углеводы гидролизуются ферментами грибов до глюкозы, которая тормозит образование ксиланаз. Оптимальной концентрацией индукторов ксиланазы является у *B. adusta* 40 – Na –КМЦ – 0.4%; у *C. pubescens* 82 целлобиозы – 2.5 мМ и у *F. pinicola* 47 Na- КМЦ-0,2% и ФБ – 0.3%.

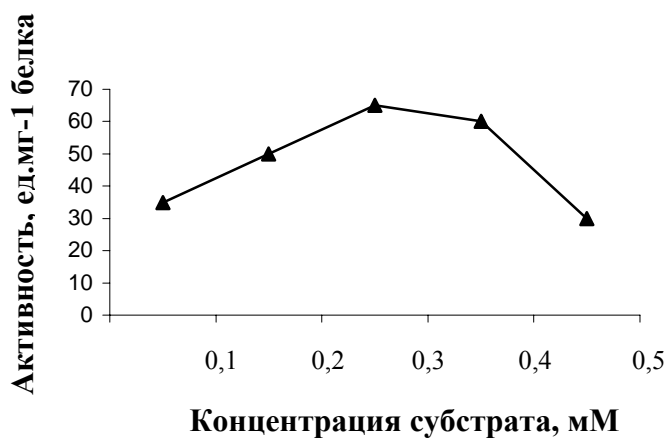
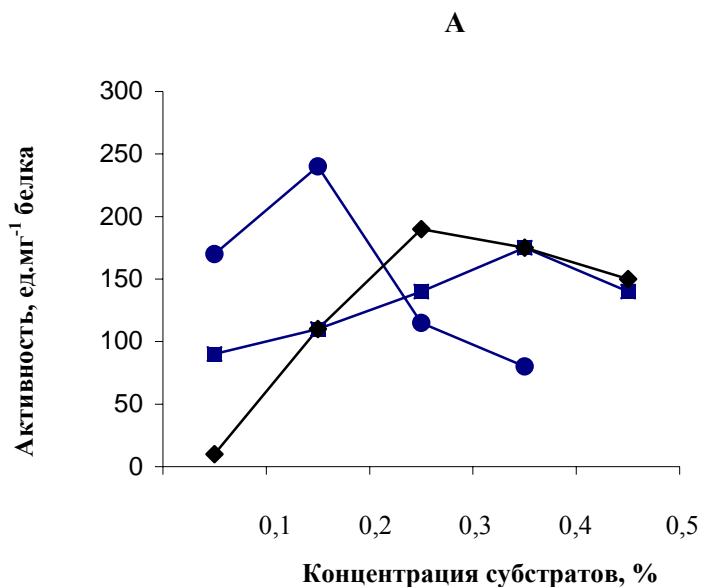


Рисунок 1. Влияние концентрации субстрата на индукцию ксиланазы: А -Na-КМЦ (●-●) через 5 часов и ФБ (◆-◆) у *F.pinicola* 47; Na-КМЦ (●-●) у *B.adusta* 40 через 3 часа; В – Целлобиоза (▲-▲) у *C.pubescens* 82 через 3 часа.

На рисунке 2 показано, что при концентрации мицелия 4,2 мг/мл наблюдается увеличение активности ксиланазы в 2 раза по сравнению с исходной, а при более высокой концентрации (6 мг/мл) биосинтез ксиланазы уменьшается.

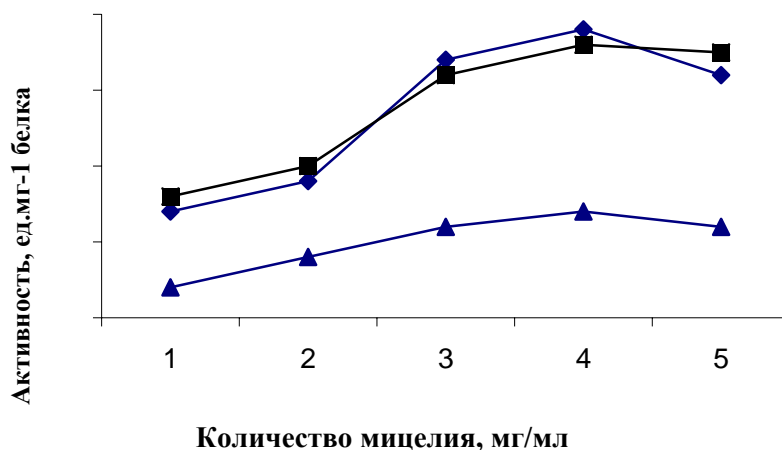


Рисунок 2. Влияние количества мицелия на индукцию ксиланазы целлобиозой у *C. pubescens* 82 (▲-▲); ФБ у *F. pinicola* 47 (◆-◆) и Na-КМЦ у *V. adusta* 40 (■-■) через 3 часа.

Таким образом, увеличение индукторов выше 0.5%, 3.5 мМ и мицелия более 4.2 мг/мл приводило к понижению биосинтеза ксиланазы мицелием грибов. По литературным данным наиболее высокие показатели активности ксиланаз зарегистрированы после индукции их целлобиозой, Na – КМЦ и ксиланом при 0.75 мМ и 1%, соответственно, у *Schizophyllum commune* (8). Следовательно, субстрат, вызывающий индукцию синтеза ксиланазы, может меняться в зависимости от вида или штамма грибов.

Поскольку имеются данные о возможном влиянии pH среды на индукции ферментов (6), нами было изучено влияние pH в диапазоне 4-8 на индукцию ксиланаз (рис. 3). Был обнаружен один максимум образования ксиланазной активности при pH 5 у грибов *V. adusta* 40 и *C. pubescens* 82 и pH 6 у *F. pinicola* 47. Значительное снижение ее активности происходило при pH 8.

Таким образом, оптимальной концентрацией индукторов ксиланазы у *F. pinicola* 47 являлось: Na – КМЦ – 0.2%, ФБ – 0.3%; у *V. adusta* 40 – Na – КМЦ – 0.4%; у *C. pubescens* 82 – целлобиоза – 2.5 мМ. Оптимальное количество мицелия для трех штаммов оказалось 4.2 мг/мл.

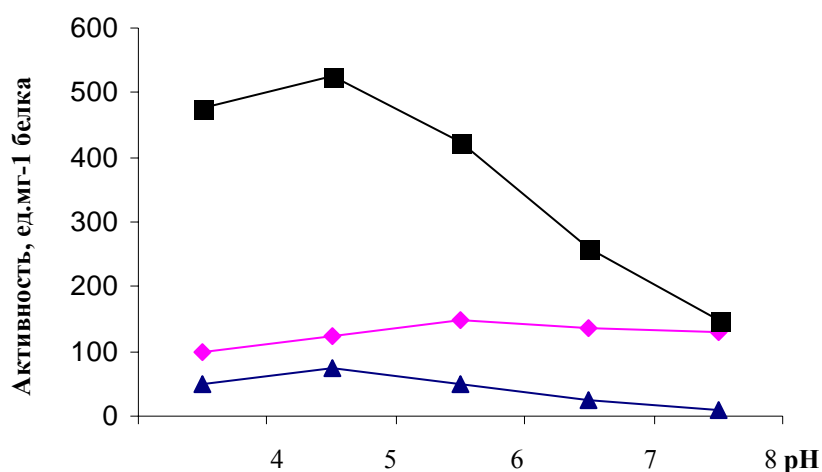


Рисунок 3. Влияние pH среды на индукцию ксиланазы индукторами Na-KMЦ у *B.adusta* 40 (■ - ■), целлюбозой у *C.pubescens* 82 (▲ - ▲) и ФБ у *F.pinicola* 47 (◆ - ◆).

Кислотность среды, оптимальная для индукции синтеза ксиланазы, составляла pH 5.0 у *B. adusta* 40 и *C. pubescens* 82 и pH 6.0 у *F. pinicola* 47. Значительное подавление индукции синтеза ферментов у всех штаммов наблюдалось при pH 7,0-8,0.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахмедова И.Д., Ганбаров Х.Г., Мурадов П.З. //Вестник Бакинского Унив-та, 2003, №3,с.65-70.
2. Вавилова Е.А., Винецкий Ю.П. // Прикл. биохимия и микроб-я, 2003, т.39,№2,с. 167-172.
3. Ганбаров Х.Г., Мурадов П.З., Атакишиева Я.Ю.//Микол. и ф/п.-1986.-Т.20.- Вып.6.-С.485-489.
4. Ганбаров Х.Г. Автореф. дис.д-ра биол. наук.-М., 1990.-47с.
5. Ганбаров Х.Г., Мурадов П.З., Сулейманова Г.Ч.// Тез. докл. Всес. конф.14-18 окт. 1991 г- Черновцы, 1991.-С182-183..
6. Иванова И.И.//Микроб-я .-1986.-Т.55.-Вып.6.-С.910-917.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия.М. : Высш. школа., 1973.343 с.
8. Rho D., Desrochers M., Jurasek L.// J. Bacter. – 1982.-V.149.-P.47-53.
9. Sandhiu D.K., Kalra M.K.// Trans. Brit. Mycol. Soc.1982, 179,p.409-410.
10. Sternberg D., Mandels M.// J. Bacteriol. 1979.V.139.P.761-769.
11. Whitakker J.R., Granum P.E.// Analytical Biochem.1980,w.109,p.156-159.

AĞACÇÜRÜDƏN BAZİDİLİ GÖBƏLƏKLƏRDƏ KSİLANAZANIN İNDUKSİYASI

İ.C.ƏHMƏDOVA, X.Q.QƏNBƏROV

ANNOTASIYA

B. adusta, C. pubescens və F. pinicola göbələklərində ksilanaza fermentinin sintezinin induksiyası öyrənilmişdir. Tədqiqat zamanı müəyyən olunmuşdur ki, F. pinicola – da ksilanazanın induktoru optimal qatılığı : Na- KMS-0,2 %, FK 0,3 %, B. adusta – da Na-KMS-0.4 %; C. pubescens – də sellobioza –2,5mM-dir. Hər üç ştam üçün miselinin optimal miqdarı – 4,2 mq/ml müəyyən olunmuşdur. Ksilanaza fermentlərinin sintezi həm də mühitin turşuluğundan asılı olmuşdur.

INDUCTION OF XYLANASES BY WOOD – ROTTING BASIDIAL FUNGI

I.J.AKHMEDOVA, Kh.G.GANBAROV

ABSTRACT

The induction of the synthesis xylanases from B. adusta, C. pubescens and F. pinicola strains has been studied. The three enzymes differed in the concentration of inducers: the synthesis of xylanase from B. adusta was most pronounced at Na – KMC – 0,4%; from C. pubescens – at cellobiosa – 2,5 mM; from F. pinicola at Na- KMC – 0,2%.

The synthesis of the enzymes depend on the amount of the mycelium and pH of medium importantly.