

**CORİOLUS CİNSLİ GÖBƏLƏKLƏRİN SELLÜLAZA FERMEHTİNİN  
BƏZİ MOLEKULYAR XASSƏLƏRİ****X.Q.QƏNBƏROV, G.Ç.SÜLEYMANOVA***Bakı Dövlət Universiteti***E-mail: khuda.49@mail.ru**

*Coriolus cinsli termotolerant ağacçürüdən qov göbələklərinin endoqlükanaza fermentinin bəzi molekulyar xassələri (temperatur və pH optimumu, termoinaktivasiyası, substrat üzərində adsorbsiyası və ingibirləşmə dərəcəsi) öyrənilmişdir. Bu göbələklərin endoqlükanazaları rəqabətsiz tormozlanma tipinə məruz qalır, termostabilliyinə görə endoqlükanaza fermenti bir-birindən fərqlənən bir neçə izomerə malikdir. Coriolus pubescens 82 göbələyinin endoqlükanaza fermenti çox yüksək temperatur (65° C) və nisbətən aşağı pH (pH 3,5) optimumlarına malikdir.*

Ağacçürüdən ali bazidili göbələklər, ilk növbədə qov göbələkləri güclü ferment sisteminə malikdirlər və bunun sayəsində bitki substratlarının parçalanmasında aktiv iştirak edərək, maddələr dövrənində əhəmiyyətli rol oynayırlar.

Bu göbələklər tədqiqatçıların diqqətini bir neçə istiqamətdə cəlb edirlər ki, bunlardan biri göbələklərin sellülaza, ksilanaza, liqninaza, pektinaza və başqa fermentlərin aktiv produsentləri olmasıdır (3).

Əsas maraq doğuran fermentlər, termostabil fermentlərdir ki, onların produsentləri termofil və ya termotolerant mikroorqanizmlərdir (1,4).

Sellülazanın substratı hidrolizetmə səmərəliliyi əhəmiyyətli dərəcədə termostabillik, adsorbsiya xüsusiyyəti, son məhsulla tormozlanmaya qarşı həssaslıq və bu kimi molekulyar xassələri ilə bağlıdır (6).

Fermentlərin səmərəliliyini təyin edən molekulyar xassələri çox az öyrənilmişdir. Yalnız ağacçürüdən bazidili Bjerkandera adusta göbələyinin endoqlükanazasının molekulyar xassəsi məlumdur (5).

Qeyd etmək lazımdır ki, ferment produsentləri kimi məlum olan ağacçürüdən bazidili göbələk nümayəndələri mezofil orqanizmlərdir, onların fermentləri isə yüksək termostabilliyə malik deyillər. Rütubətli – subtropik Talış meşələrindən ayrılan Coriolus cinsli göbələklərin bəzilərinin isə termotolerant olması məlumdur (2).

Bundan əvvəlki tədqiqatlarda Coriolus cinsli termotolerant göbələklərin fermentativ xassələri öyrənilmişdir (3).

Təqdim olunan işin məqsədi termotolerant ağacçürüdən qov göbələklərindən alınmış endoqlükanazanın biotexnoloji vacib molekulyar xüsusiyyətlərini öyrənmək olmuşdur.

### Material və metodlar

Tədqiqat işində *Coriolus cervinus* ştam 28 və 128, *C. hirsutus* ştam 61, *C. pubescens* ştam 82, termotolerant qov göbələklərinin mitselili kulturalarından istifadə olunmuşdur.

İnokulyum almaq üçün aşağıdakı sintetik duru qidalı mühitdən istifadə olunub: (q/l) qlükoza-10, pepton-3, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-1.5, NaCl-0.5, Mg-SO<sub>4</sub>-0.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-0.4 və distillə suyu-11, pH-5.5. Qidalı mühitin sterilizasiyası 0.5 atm, təzyiqdə 0.5 saat avtoklavda aparılmışdır.

Soyudulmuş qidalı mühitə 2-3 parça göbələk mitselisi daxil edərək, 5 sutka ərzində 37° C becərilmişdir. Alınmış biokütlə maqnit qarışdırıcısının köməyi ilə steril olaraq suspenziya halına salındıqdan sonra əkin materialı (inokulyum) kimi istifadə olunmuşdur.

Göbələk kulturası bərk fazalı fermentasiya şəraitində buğda kəpəyində becərilmişdir. Nəmləşdirilmiş və sterilizə olunmuş buğda kəpəyinə (petr qabında) 1ml göbələk suspenziyası əlavə edilərək əkilmiş və 37°C hərərdə 4-5 sutka ərzində becərilmişdir. Alınmış biokütlə 45°C-də qurudulmuş və ondan məlum üsulla 10%-li cövhər hazırlanmışdır. Cövhər filtdən süzüləndən sonra alınan hissə ferment məhlulu kimi istifadə olunmuşdur (3).

Endoqlükanazanın aktivliyi viskozimetrik metodla təyin edilmişdir. Substrat kimi 0.1M NaCl-lu asetat buferində (0.05M pH 4.5) hazırlanmış 0.3-0.4% karboksimetilsellüloza (KMS) məhlulundan istifadə olunub.

Endoqlükanaza aktivliyinin vahidi kimi reaksiyanın əvvəlində 1mmol qlükozid əlaqələrini 1dəqiqə ərzində parçalayan ferment miqdarı götürülmüşdür (vah/mg/zülal).

Fermentin substrata möhkəm adsorbsiya olunmuş (ekstraksiya olunmayan) və zəif adsorbsiya olunmuş və ya adsorbsiya olunmamış (ekstraksiya olunan) miqdarını təyin etmək üçün alınmış biokütlədən sulu cövhər aldıqdan sonra çöküntü 2 dəfə bufer məhlulu ilə yuyulmuşdur. Bu yolla zəif adsorbsiya olunan ferment də məhlula keçirildikdən sonra, alınan sulu cövhər ilə sonrakı bufer məhlulu birləşdirilmiş və orada ekstraksiya olunan fermentin miqdarı təyin edilmişdir.

Çöküntünün 1q-na 10ml 1% -li KMS və 20ml bufer məhlulu əlavə edilərək, qarışıq 50°C-də 30 dəq inkubasiya edilmişdir. Əmələ qələn sadə şəkərlərin miqdarına görə fermentin aktivliyi təyin olunmuşdur. Fermentin ekstraksiya olunmayan hissəsinin (E) miqdarı aşağıdakı düstur əsasında hesablanmışdır.

$$E = \frac{E1}{E1 + E2} 100\%$$

Burada E1 - fermentin çöküntüdə olan aktivliyi, E2 - sulu cövhərdə (məhlulda) olan fermentin aktivliyidir.

Endoqlükanazanın adsorbsiya olunma xassəsi yuyulma əmsalına görə A.Klyosovun (A.Klesov) metodu üzrə təyin edilmişdir (4).

Endoqlükanazanın hidroliz məhsulları ilə ingibirə olunması məlum üsul ilə təyin olunmuşdur və bu zaman ingibitor kimi qlükoza və sellübioza istifadə olunmuşdur (6).

Fermentin termoinaktivasiyası 65,70 və 75°C temperaturda öyrənilmişdir (6).

Fermentin temperatur optimumu 30-70°C və pH optimumu isə 3,5-6,0 intervalında təyin olunmuşdur (7).

### Nəticələr və onların müzakirəsi

Endoqlükanazanın hidroliz məhsulları ilə ingibirə olunmasının (tormozlanmasının) öyrənilməsi göstərdi ki, qlükoza ən yüksək qatılıqda belə (205g/l) qov göbələklərindən alınmış fermentin tormozlanmasına səbəb olmur. Məlumdur ki qlükoza kif göbələklərindən alınmış endoqlükanaza üçün səmərəli ingibitor deyil (6). Ona görə də endoqlükanazanın tormozlanması sellobioza ilə aparılıb və substrat kimi həll olmayan (amorf) rənglənmiş sellülozadan istifadə edilib.

Sellobioza ilə tormozlanmaya ən aşağı həssaslığa *Coriolus cervinus* 28 və 128 göbələklərindən alınan endoqlükanazalar malik olmuşlar. *C. pubescens* 82 göbələyinin endoqlükanazası *C. cervinus* göbələyinin endoqlükanazasından tormozlanmaya 2 dəfə çox həssaslıq göstərmişdir. Bütün hallarda rəqabətsiz tormozlanma müşahidə olunmuşdur (cədv. 1). Belə növ tormozlanma həm bakteriyaların, həm də kif göbələklərinin endoqlükanazaları üçün məlumdur.

Sellülazaların 65°C və daha yüksək temperaturda fəaliyyət göstərməsi, sellülaza preparatlarının istifadəsi üçün vacib şərtlərdən biridir. Çünki bu, proses zamanı mikrobla yoluxma ehtimalını azaldır və reaksiya sürətini artırır. Qov göbələklərinin endoqlükanazalarının termostabillik göstəriciləri 2-ci cədvəldə öz əksini tapmışdır. *C.hirsutus* və *C.cervinus* göbələklərinin endoqlükanazaları aşağı termostabillik göstərmişlər. *C.pubescens* 82 göbələyinin endoqlükanazası isə son dərəcə yüksək termostabillik göstərmişdir. Belə ki, 65°C-də 2 sutka ərzində

Cədvəl 1

### Termotolerant ağacçürüdən qov göbələklərinin endoqlükanazalarının sellobioza ilə ingibirləşməsinin əmsalları (konstantaları)

Ferment mənbəyi (göbələklər)	K, q/l M±m	ingibirləşmə tipi
<i>Coriolus cervinus</i> 28	121±9	rəqabətsiz
<i>Coriolus cervinus</i> 128	126±8	“___”
<i>Coriolus hirsutus</i> 61	105±7	“___”
<i>Coriolus pubescens</i> 82	68±4	“___”

Cədvəl 2

### Termotolerant qov göbələklərinin endoqlükanazalarının 65°C-də termostabilliyi

Ferment mənbəyi (göbələklər)	Yarım inaktivasiya vaxtı (dəq)
<i>Coriolus cervinus</i> 28	5,0 ± 0,3
<i>Coriolus cervinus</i> 128	5,5 ± 0,2
<i>Coriolus hirsutus</i> 61	12 ± 0,4
<i>Coriolus pubescens</i> 82	2 sutka ərzində inaktivləşməyib (264 ± 12,4 – 70°C-də)

**Mikrokristallik sellülozada termotolerant qov göbələklərinin  
Endoqlükanazalarının adsorbsiya əmsalı  
(bərabər miqdarda paylanma koeffisienti-Kp)**

Ferment mənbəyi (göbələklər)	Kp, l/q (%)	
	ekstraksiya olunmayan hissə	ekstraksiya olunan hissə
Coriolus cervinus 28	0,017 (32)	0,015 (68)
Coriolus cervinus 128	0,023 (33)	0,022 (67)
Coriolus hirsutus 61	0,04 (29)	0,03 (71)
Coriolus pubescens 82	0,25 (25)	0,017 (75)

fermentin aktivliyi tormozlanmamış və 70°C-də fermentin yarımaktivasiya vaxtı 264 dəqiqə təşkil etmişdir (cədv. 2). Qeyd etmək lazımdır ki, göbələk kulturası 45°C-dən yuxarı temperaturda inkişaf edə bilmir. Deməli, fermentin temperatura davamlılığı göbələyin temperatura davamlılığı ilə müəyyənləşmir və fermentin temperatura davamlılığı göbələyə nisbətən daha geniş sərhədlərə malik ola bilər.

*C. pubescens* 82 göbələyinin sellüloza kompleksi bütün komponentlərinin 70°C-də termostabilliyinin öyrənilməsi göstərdi ki, ən yüksək termostabilliyə β-qlükozidaza (inaktivasiya vaxtı 1232 dəqiqə) ən az termostabilliyə filtr kağızı üzrə sellüloza (inaktivasiya vaxtı 108 dəqiqə) malikdirlər.

Endoqlükanaza və karboksimetilsellüloza üzrə sellüloza inaktivasiya vaxtına görə bir-birindən seçilmirdilər və pilləli enmə aktivliyinə malikdirlər (şəx. 1). İnkubasiyanın 4 saati ərzində aktivlik 35% aşağı düşmüşdür, sonra 4 və 5-ci saatlar arasında sınıma baş vermişdir. Belə ki, aktivlik kəskin - 30% -ə qədər aşağı düşür, 5 saatdan sonra aktivliyin zəifləməsi səngiyir, 5 və 8-ci saatlarda aktivlik 7% aşağı düşür. Deməli, *C. pubescens* 82 göbələyinin endoqlükanazasının termostabilliyə görə fərqlənən ən azı 2 izofermenti mövcuddur.

*C. cervinus* və *C. hirsutus* göbələklərinin endoqlükanazaları üçün termostabilliyə görə fərqlənən izoformalar müşahidə olunmamışdır.

Sellülazanın substrat (sellüloza) üzərində adsorbsiya olmaq xassəsi bərabər paylanma əmsalı (Henri əmsalı) əsasında müəyyən olunmuş və alınan nəticələr 3-cü cədvəldə verilmişdir. *C. pubescens* və *C. cervinus* göbələklərinin endoqlükanazaları nisbətən yüksək paylanma əmsallarına (Kp) malik olmuşlar. Qeyd etmək lazımdır ki, termotolerant göbələklərin endoqlükanazaları, *Bjerkandera* cinsli ağacçürüdən qov göbələklərinin endoqlükanazaları ilə müqaisədə ümumən aşağı paylanma koeffisienti ilə xarakterizə olunurlar (5).

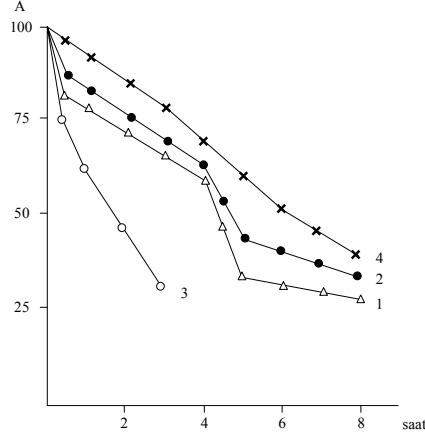
Tədqiq etdiyimiz göbələklərin endoqlükanazaları üçün xarakterik izotermilər hiperbola şəklindədir. Bu, sellülozada adsorbsiya olunma xüsusiyyətinə görə bir neçə izofermentin olmasına dəlalət edir.

Göbələklərin sellüloza komplekslərində güclü və zəif adsorbsiya edən izofermentlərin olması liqnosellüloza substratlarında həm amorf, həm də kristallik sellüloza sahələrinin yüksək effektiv hidrolizini təmin edə bilər. Deməli, *Coriolus* cinsli termotolerant qov göbələklərinin sellülazaları bu cəhətdən mükəmməl fermentlərdir.

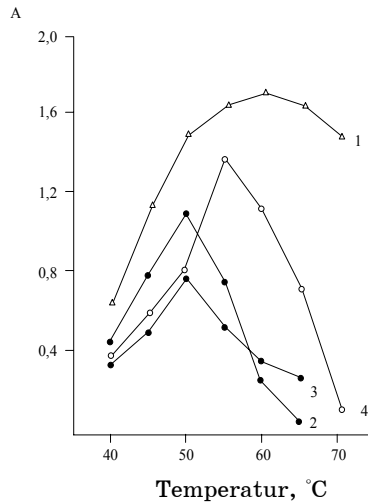
Göbələklərin endoqlükanazaları temperatur optimumlarına görə bir-birindən fərqlənirlər. Ən yüksək temperatur optimumu *C. pubescens* 82 göbələyindən alınan endoqlükanazada müşahidə olunmuşdur. Ferment 60°C, hətta 70°C belə yüksək aktivlik göstərmişdir. Lakin *C.cervinus* və *C.hirsutus* göbələklərinin endoqlükanazaları müvafiq olaraq 50 və 55°C temperatur optimumuna malik olmuşlar (şək. 2).

Göbələklərin endoqlükanazaları pH optimumlarına görə də fərqlənmişlər (şək.3). Belə ki, *C.pubescens* 82-dən alınan endoqlükanaza daha turş mühitlərdə (pH 3,8) yüksək aktivlik göstərmişdir. *C.cervinus* və *C.hirsutus*un endoqlükanazaları isə müvafiq olaraq pH 4,5 və 4,3-də yüksək aktivliyə malik olmuşlar. Deməli, *Coriolus* cinsli termotolerant göbələklərin endoqlükanazaları daha turş mühit göstəricilərinə malikdirlər ki, bu onları müxtəlif termofil bakteriya və kif göbələklərinin endoqlükanazalarından əhəmiyyətli dərəcədə fərqləndirir (4).

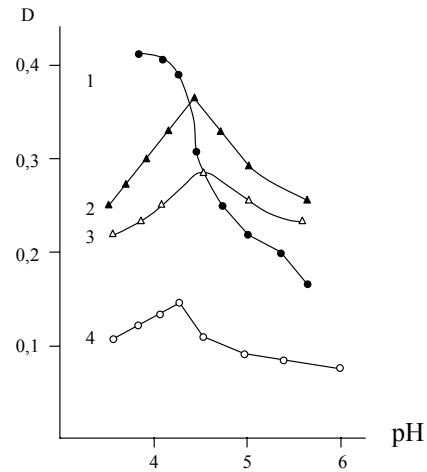
Beləliklə, *C. pubescens* 82-dən alınan ferment yüksək termostabiliyə malik olub, termostabiliyi ilə fərqlənən bir neçə izofermentdən ibarətdir. Bu göbələklərdən alınan endoqlükanaza da yüksək temperatur və turşuluq optimumlarına malikdir.



**Şək. 1.** *Coriolus pubescens* 82 göbələyinin ferment kompleksinin 70°C-də və pH 3,9 substratsız termoinaktivasiyası:  
1 – endoqlükanaza; 2 – KMS-sellülaza;  
3 – FK-sellülaza; 4 –  $\beta$ -qlükozidaza;  
A – Fermentlərin nisbi aktivliyi, %.



Şək. 2. Termotolerant qov göbələklərinin endoqlükanazalarının temperaturdan asılılığı: *Coriolus pubescens* (1), *C.cervinus* 28 (2) və 128 (3); A – ferment aktivliyi vah·q<sup>-1</sup> preparat.



Şək. 3. Termotolerant qov göbələklərinin endoqlükanazalarının mühit pH-dan asılılığı: *Coriolus pubescens* 28 (2) və 128 (3), *C.hirsutus* (4) *C.pubescens* 82 (1); D – optiki sıxlıq.

#### ƏDƏBİYYAT

1. Билай Т.П. Термофильные грибы и их ферментативные свойства. Киев: Науково думка, 1985, 170 с.
2. Ганбаров Х.Г. Эколого-физиологические особенности дереворазрушающих высших базидиальных грибов. Баку: Элм, 1990, с. 48-49.
3. Ганбаров Х.Г., Сулейманова Г.Ч. Влияние физиологических факторов на целлюлолитическую активность дереворазрушающих грибов // Материалы конфер. «Современные проблемы биологии». Баку: 2000, с.142-145.
4. Клесов А.А. Целлюлазы третьего поколения // Биотехнология. 1987, №2, с.132-138.
5. Muradov P.Z. Bazidili göbələklərin intensiv üsulla becərilməsi zamanı produsent seçiminin bəzi xassələri // Mikrobiologiya İnstitutu elmi əsərlər toplusu. 2000, s. 25-30.
6. Нуцубидзе Н.Н., Тодоров П.Т., Квеситадзе Э.Г. Молекулярный скрининг целлюлаз различного биологического происхождения // Тезисы Всесоюзной конференции на тему: «Выделение, очистка и анализ биологически активных соединений». Сухуми: 1987, с.39.
7. Süleymanova G.Ç. Qov göbələklərinin fermentativ aktivlik səviyyəsinin mövsümi dəyişkənliyi // Tətbiqi biologiyanın problemləri Respublika elmi konfransının materialları. Bakı: 2007, s.174.
8. Qanbarov Kh.G., Guliyeva N A., Muradov P.Z. Biosynthesis of pektinase by fungi of the genera *Bjerkandera* and *Coriolus* during solid-state fermentation // Applied Biochemistry and mikrobiology, 2001. v. 37, 6, p. 593-595.

## **МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СВОЙСТВА ЦЕЛЛЮЛАЗ ГРИБОВ РОДА CORIOLUS**

**Х.Г.ГАНБАРОВ, Г.Ч.СУЛЕЙМАНОВА**

### **РЕЗЮМЕ**

В данной работе были исследованы важные молекулярные свойства (степень ингибирования, термоинактивация, температурный и pH оптимумы) эндоглюканазы из термотолерантных дереворазрушающих трутовых грибов рода *Coriolus*. У эндоглюканазы термотолерантных трутовых грибов наблюдается неконкурентный тип ингибирования. Ступенчатая термоинактивация эндоглюканазы у данных грибах свидетельствует о наличии нескольких изоформ, различающихся по термостабильностью. Эндоглюканаза гриба *C.pubescens* 82 обладает высоким температурным (65°C) и относительно низким pH оптимумами.

## **THE MOLECULAR FEATURES OF CELLULASE OF CORIOLUS GENUS FUNGI**

**Kh.Q.QANBAROV, G.KH.SULEYMANOVA**

### **SUMMARY**

The article studies the important molecular features (the degree of inhibition, thermoinactivation, temperature and pH optimums) of endogluconase from thermotolerant wood-destroying tinder fungi of *Coriolus* genus. The uncompetitive type of inhibition is observed in endogluconase of thermotolerant fungi. Ladder-shaped thermoinactivation of endogluconase in these fungi indicate the presence of several isoforms, which differ in thermostability. The endogluconase of fungus *C.pubescens* 82 has high temperature (65°C) and rather low pH optimums.