

ИЗУЧЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ТЕРМИТОВ ПО ДЕГРАДАЦИИ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ИХ ИНАКТИВАЦИИ ФТОРИДОМ НАТРИЯ

Рахимов М.М.

Юлдашева Д.Д.

Ташкентский государственный технический университет

Ключевые слова: термит, целлюлаза, целлюлоза, эндо- α -1,4- глюканы, целлобиогидролазы, β -глюкозидазы.

Key words: termite, cellulase, cellulose, endo- α -1,4-glucanases, cellobiohydrolases, β -glucosidases.

Термиты наносят серьезный вред деревянным конструкциям культурно-исторических памятников, объектам стратегического назначения, гидротехническим сооружениям, населенным пунктам и административным зданиям. Одна семья термитов из 25 тысяч особей, обитающая в 100 см³ объема, в год потребляет в среднем до 50 тысяч см³ различного вида целлюлозы. Вместе с тем все это приводит к глобальному круговороту углерода и повышению в атмосфере концентрации парникового газа – диоксида углерода. Все это осуществляется за счет пищеварительных секретов термитов и ферментов симбионтов, а также за счет активности биохимических процессов.

Термиты имеют специализированную систему переваривания целлюлозы. Различные целлюлазы участвуют в деградации целлюлозы у термитов и их симбионтов. Важным направлением исследований является изучение целлюлазной активности термитов. Три основных типа целлюлаз-это эндо- α -1,4- глюканы, целлобиогидролазы и β -глюкозидазы, и деградация целлюлозы требует синергического действия трех типов гликозидгидролаз. Модели и характеры целлюлаз у термитов и их симбионтов были широко описаны, а целлюлазная активность целлюлаз и их распределение в пищеварительной системе были различными у различных видов термитов. В последнее время в основном изучались распределения различной активности целлюлазы в каждом сегменте кишечника термитов, и обнаружили, что экспрессия генов эндогенной целлюлазы переместилась из слюнных желез низших термитов в среднюю кишку высших термитов.

Нашим объектом исследований является термиты рода *Anacanthotermes*

turkestanicus. Термиты были привезены из разных областей Узбекистана.

Анализ активности целлюлазы. В двух пробирках суспензировали по 50 мг окрашенного субстрата в 4 мл 0,1 М ацетатного буфера (pH=4,5) при 40°C, перемешивая на магнитной мешалке 5 мин. Затем в одну пробирку добавляли 0,1 мл раствора, содержащего 2-6 мг ферментного препарата, продолжая перемешивать. В другую пробирку также добавляли 0,1 мл указанного раствора ферментного препарата, и содержимое быстро пропускали через фильтр (контроль). Через 20 мин. реакцию смесь в первой пробирке пропускали через фильтр и определяли оптическую плотность фильтрата при длине волны 490 нм для ОЦ-31 и 375 нм для НОЦ-ОХ против контрольной пробы.

Оптическую плотность гидролизатов измеряли на спектрофотометре «Spekol-II» (ГДР). Целлюлазную активность определяли по результатам трех параллельных измерений согласно формуле:

$$A \text{ (усл. ед./г)} = \frac{D \cdot 1000}{M};$$

где D -оптическая плотность гидролизата, M -масса ферментного препарата, взятого для анализа.

За условную единицу активности принимали активность такого количества фермента, которая образует 1 ед. оптической плотности при 500, 490, 410 или 375 нм (в зависимости от типа красителя) за 20 мин.

Результаты и обсуждение.

Было изучено влияние ингибиторов на целлюлазную активность фермента термитов. Полученные данные говорят о том, что фторид натрия в концентрации 10 мг/л ингибирует целлюлазную активность во всех образцах и, хотя этот эффект проявляется в разной степени (снижение активности от 1,5 до 5 раз).

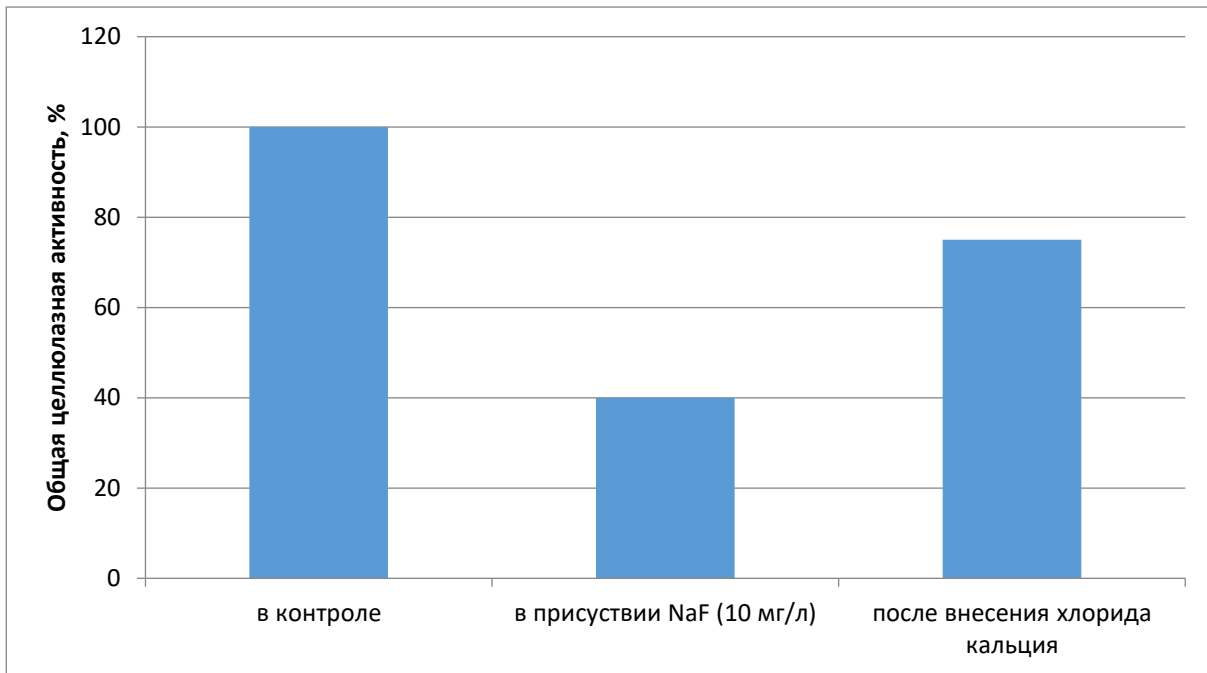


Рис. 1. Реактивация фермента брюшной части термита хлоридом кальция после фторид-зависимого ингибирования целлюлазной активности

Что касается динамического сдвига у термитов, то наши результаты показали, что целлюлазная активность и деградирующая активность фильтровальной бумаги были наиболее сильно сосредоточены в кишке изученных термитов, чем у других образцов (части тела, образцы I и II) термитов, что подтверждающие исследования ЭГ, динамическое изменение целлюлазной активности подтверждают соответствующему отчету Fujita A., T. Miura, T. Matsumoto (2008) и Tokuda G (2009). Они предположили, что основное положение активности к голове/передней кишке с эволюцией древесных термитов, и эволюционировавшие древесные термиты, такие как термиты Rhinotermitidae и Termitidae, могут иметь более высокую активность БГ в грудной части тела термита.

Что касается сравнения активности целлюлазы в целых телах термитов, то было высказано предположение, что деградирующая активность фильтровальной бумаги и процентное содержание СВН в полных целлюлазах увеличиваются со средней повышением эволюционного статуса.

Полученные данные показывают полученные суспензии от разных мест тело термитов после фильтрование наибольшее гидролизуют целлюлозу в виде фильтровальной бумаги, чем суспензии без фильтрованием это тоже

доказывают что имеющие разных веществ в составе субстрата отрицательно влияет на биodeградацию образцов целлюлозы (в виде фильтровальной бумаги). Полученные данные даёт возможность сделать вывод в том что термиты в грудной и брюшной части, целлюлазная активность термита постепенно уменьшается. Эту явлению можно объяснить тем что в составе полученной суспензии имеются разные примеси и они могут влиять на целлюлазную активность, так как не однократно било доказано что на активность целлюлазы могут влиять мультиномиальные факторы, такие как температура, субстрат, состояние и состав субстрата.

Было показано, что фторид натрия в концентрации 10 мг/л ингибирует целлюлазную активность во всех образцах и, хотя этот эффект проявляется в разной степени (снижение активности от 1,5 до 5 раз).

Переведённый на рисунке служит доказательством того, что наблюдаемый эффект определяется именно фторид-анионом, является эксперимент, в ходе которого в реакционную среду (фермент-субстрат-буфер), содержащую фторид натрия (10 мг/л), добавлялось эквимольное количество хлорида кальция. После выпадения фторида кальция в осадок происходила частичная реактивация фермента

Литература

1. Correlation of cellulase gene expression and cellulolytic activity throughout the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*. Nakashima *et al.* 2002; Tokuda *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2007
2. Watanabe H. & G. Tokuda 2010. Cellulolytic systems in insects. Annual review of entomology. 55: 609-632.
3. Willis J.D., C. Oppert, J.L. Jurat-Fuentes 2010. Methods for discovery and characterization of cellulolytic enzymes from insects. Insect Science 17(3): 184-198.
4. Tokuda G., N. Lo, H. Watanabe 2005. Marked variations in patterns of cellulase activity against crystalline- vs. carboxymethyl-cellulose in the digestive systems of diverse, woodfeeding termites. Physiological Entomology 30(4): 372-380.
5. Tokuda G., Lo N., Watanabe H., Arakawa G., Matsumoto T., Noda H. 2004. Major alteration of the expression site of endogenous cellulases in members of an apical termite lineage. Molecular Ecology 13(10): 3219-3228.
6. Nelson M.I., Kelsey R.G., Shafizaden F. Enhancement enzymatic hydrolyses by Simultaneous attrition of cellulosed Substrates. // Bio-technol and Bioeng, 1982, vol 24, p 293-294ю Малыкин В.К.ю Мазур Т.М., Бершова и др.