



УДК 577.152.321\*8.017.2

## ПРОДУЦИРОВАНИЕ $\beta$ -КСИЛОЗИДАЗЫ ДРОЖЖАМИ *Cryptococcus podzolicus*

© 2000 г. А. А. Шубаков

Институт физиологии Коми научного центра УрО РАН,  
167610, Сыктывкар, ул. Первомайская, 50

Поступила в редакцию 13.03.2000 г. Принята к печати 24.03.2000 г.

В процессе изучения особенностей продуцирования  $\beta$ -ксилозидазы у базидиомицетных дрожжей *Cryptococcus podzolicus* показано, что  $\beta$ -ксилозидаза *C. podzolicus* является индуцибельным секретир-руемым ферментом. Индукторы синтеза  $\beta$ -ксилозидазы – ксилоолигосахариды, образующиеся из ксилана, и  $\beta$ -метилксилозид. Активность фермента в среде с ксиланом или с  $\beta$ -метилксилозидом составляет 1.0 и 1.5 ед.акт./мл соответственно, что сравнимо с уровнем активности  $\beta$ -ксилозидазы у продуцентов фермента среди мицелиальных грибов.

Ключевые слова:  $\beta$ -ксилозидаза; дрожжи; *Cryptococcus podzolicus*.

### ВВЕДЕНИЕ

Дрожжи *Cryptococcus podzolicus* при росте на средах с ксиланом наряду с эндоксилазой (1,4- $\beta$ -D-ксила-н-ксиланогидролаза, КФ 3.2.1.8) [1] синтезируют  $\beta$ -ксилозидазу (1,4- $\beta$ -D-ксила-н-кси-логидролаза, КФ 3.2.1.37).  $\beta$ -Ксилозидаза играет важную роль в общей конверсии ксилана в ксило-зу, аналогичную роли  $\beta$ -глюкозидазы при саха-рификации целлюлозы целлюлазами [2]. Эндо-ксилаза гидролизует  $\beta$ -1,4-гликозидные связи D-ксилопиранозидных единиц в ксилане, образуя ксилоолигосахариды.  $\beta$ -Ксилозидаза катализирует гидролиз ксилоолигосахаридов, полученных из ксилана, последовательно удаляя остатки ксило-зы с невозстановливающего конца [3–5].  $\beta$ -Кси-лозидазы мицелиальных и особенно дрожжевых грибов изучены в меньшей степени, чем эндокси-лаза.

В данной работе представлены результаты изучения локализации  $\beta$ -ксилозидазы у базидио-мицетных дрожжей *C. podzolicus* и особенностей ее продуцирования.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что среди различных компонентов питательной среды особенно сильное влияние на синтез ферментов оказывают источники углеро-да. Культура *C. podzolicus* синтезирует  $\beta$ -ксилози-дазу в среде, содержащей в качестве источника углерода ксилан, с удельной активностью около 1.0 ед.акт./мл. В среде с другими испытанными ис-точниками углерода (глюкоза, ксилоза, ацетат,

цитрат, малат, этанол) активность фермента не обнаруживалась. Многие  $\beta$ -ксилозидазы микро-организмов были описаны как индуцибельные ферменты [6]. Исходя из наших данных, можно полагать, что  $\beta$ -ксилозидаза *C. podzolicus*, по-видимому, также относится к индуцибельным фер-ментам. Вероятно, синтез фермента индуцирует-ся не самими полимерными молекулами ксилана, а ксилоолигосахаридами, образующимися в про-цессе гидролиза ксилана эндоксилазой.

На образование ферментов могут существен-но влиять и источники азота. Культивирование *C. podzolicus* в средах, содержащих индуктор (кси-лан) и разные источники азота, показало, что на-ибольшая активность  $\beta$ -ксилозидазы наблюдает-ся в присутствии органического источника азота (гидролизат казеина, пептон). При использовании неорганических источников азота ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) активность фермента была ниже.

Следовательно, максимальное накопление  $\beta$ -ксилозидазы *C. podzolicus* происходит при нали-чии в среде органического источника азота в при-сутствии ксилана.

$\beta$ -Ксилозидаза мицелиальных и дрожжевых грибов в отличие от ксиланазы обычно определя-ется как фермент, связанный с клеткой [7, 8]. Для выяснения локализации  $\beta$ -ксилозидазы *C. pod- zolicus* нами исследовано распределение активнос-ти данного фермента по следующим фракциям: культуральная жидкость, цитозоль, клеточные осколки. Эксперимент проведен в среде с 1% кси-ланом в разные периоды культивирования: при переходе культуры к активному росту (12 ч), во время экспоненциального роста (18 ч) и при пере-ходе в стационарное состояние (24 ч).  $\beta$ -Ксилози-

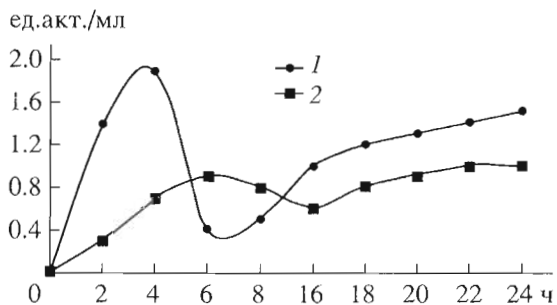
Распределение активности  $\beta$ -ксилозидазы (%) *Cryptococcus podzolicus* ВКМ Y-2113 по клеточным фракциям в среде с 1% ксиланом

Фракция	Время культивирования, ч		
	12	18	24
Культуральная жидкость	86.7	87.8	77.0
Цитозоль	13.3	12.2	23.0
Клеточные осколки	0.0	0.0	0.0

даза *C. podzolicus* в отличие от ксилозидаз многих других микроорганизмов является секретрируемым ферментом и большая часть ее обнаруживается во внеклеточной среде (таблица). Как видно из таблицы, в культуральной жидкости обнаружено 77.0–87.8% от общей активности фермента, а в клетках, именно в цитозоле, – 12.2–23.0%. Во фракции клеточных осколков активность  $\beta$ -ксилозидазы не была обнаружена. В процессе культивирования доля внеклеточной  $\beta$ -ксилозидазы уменьшается (на 10.8%), и соответственно увеличивается количество фермента в цитозоле.

Секретрируемая форма  $\beta$ -ксилозидазы была ранее обнаружена также у штаммов *Aureobasidium pullulans* [9] и *C. albidus var. aerius* [10].

Индукция синтеза  $\beta$ -ксилозидазы *C. podzolicus* изучена более подробно в условиях отсутствия роста, то есть при культивировании клеток в среде, не содержащей источников углерода и других питательных веществ. Отмытые клетки штамма инкубировали в фосфатном буфере (рН 4.0), содержащем в качестве индуктора  $\beta$ -метилксилозид (0.3 г/л) (рисунок). Данный индуктор, как известно, является неметаболизируемым [11, 12]. Уже через 1 ч после инкубации с индуктором в среде обнаруживается активность  $\beta$ -ксилозидазы (1.4 ед. акт./мл). Это означает, что  $\beta$ -метилксилозид достаточно быстро проникает в клетки дрож-



Динамика образования  $\beta$ -ксилозидазы (ед. акт./мл) дрожжами *Cryptococcus podzolicus* ВКМ Y-2113 при инкубации клеток в фосфатном буфере (рН 4.0) с  $\beta$ -метилксилозидом (0.3 г/л) (1) и с 1% ксиланом (2). Средняя ошибка в каждой точке не превышает 10% среднего арифметического.

жей и индуцирует синтез фермента. Таким образом, время, требуемое для индукции  $\beta$ -ксилозидазы  $\beta$ -метилксилозидом, очень незначительно и составляет менее 1 ч.  $\beta$ -Ксилозидаза *C. podzolicus* активно секретрируется в среду в первые часы инкубации и к 4 ч внеклеточная активность ее составляет 1.9 ед. акт./мл. В последующие 4 ч внеклеточная активность фермента понижается до 0.4–0.5 ед. акт./мл. И далее, к 24 ч инкубации, наблюдается постепенное повышение внеклеточной активности до 1.5 ед. акт./мл.

Накопление во времени внеклеточной  $\beta$ -ксилозидазы *C. podzolicus* в условиях отсутствия роста дрожжей происходит аналогично образованию фермента при росте культуры в среде с 1% ксиланом (рисунок, кривая 2) и сходно с динамикой образования  $\beta$ -ксилозидазы у *Aspergillus ochraceus* [13], которая также интенсивно накапливается в среде в первые часы культивирования и далее наблюдается понижение ее активности.

Для ксиланазы *C. podzolicus* в отличие от  $\beta$ -ксилозидазы как в условиях отсутствия роста, так и при росте дрожжей (в среде с 1% ксиланом) наблюдается постепенное и последовательное увеличение ее активности в среде [1].

Динамика образования  $\beta$ -ксилозидазы *C. podzolicus* в среде с 1% ксиланом может быть объяснена исходя из следующего. Широко принятый взгляд на регуляцию синтеза ферментов, деградирующих полимерные субстраты, состоит в том, что полисахаридные гидролазы в низких конститивных концентрациях (базальный синтез) взаимодействуют с полимером, образуя некоторое количество растворимых “сигнальных” фрагментов, которые проникают в клетку и индуцируют синтез соответствующего фермента, деградирующего полисахарид [14–16]. Ксилан, будучи полимером, не способен проникать через плазматическую мембрану, так что сигналом для ускоренного синтеза ксиланолитических ферментов, в том числе и  $\beta$ -ксилозидазы, служат некоторые фрагменты ксилана – ксилобиоза, ксилотриоза и, возможно, другие ксилоолигосахариды, которые образуются при низких конститивных (базальных) уровнях внеклеточной ксиланазы [11, 17]. Вероятно, эти ксилоолигосахариды могут в первые 4–6 ч роста индуцировать активный синтез  $\beta$ -ксилозидазы. Далее происходит потребление культурой данных ксилоолигосахаридов и концентрация их уменьшается, что приводит к снижению индуцирующего эффекта. В связи с этим в период от 6 до 14 ч роста активность фермента не увеличивается и даже уменьшается (от 0.9 до 0.5 ед. акт./мл), возможно, из-за определенной нестабильности  $\beta$ -ксилозидазы и/или инактивации части ее метаболитами. За счет постепенного гидролиза полимерных молекул ксилана ксиланазой, образующейся в процессе роста *C. podzolicus*

все в большем количестве, в среде появляются новые порции олигомеров ксилозы, в том числе, возможно, и низкомолекулярные. Это может способствовать последующему, наблюдаемому после 14 ч роста, интенсивному биосинтезу  $\beta$ -ксилозидазы, что приводит к увеличению ее активности в среде от 0.5 ед. акт./мл (14 ч) до 1.0 ед. акт./мл (22–24 ч). Наблюдаемое в этот период роста повышение активности  $\beta$ -ксилозидазы происходит почти параллельно с увеличением активности ксиланазы [1]. Культура при этом находится в состоянии активного роста. По-видимому, биосинтез  $\beta$ -ксилозидазы, как и ксиланазы, также является ростзависимым процессом.

Таким образом,  $\beta$ -ксилозидаза дрожжей *S. podzolicus* представляет собой индуцибельный секретируемый фермент, а интенсивность его биосинтеза, по-видимому, зависит от фазы роста культуры.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали базидиомицетные дрожжи *S. podzolicus* ВКМ У-2113. Культивирование проводили в колбах (220 об/мин, 28°C) с 100 мл питательной среды следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт – 2.0, пептон – 5.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.5,  $KH_2PO_4$  – 1.7,  $K_2HPO_4$  – 0.3. Начальное значение pH среды было 4.0 без дальнейшего регулирования. Источниками углерода и энергии служили (%): глюкоза – 1.0, ксилоза – 1.0, ксилан – 1.0 (все Serva), этанол – 0.5, ацетат – 0.5, цитрат – 0.5, малат – 0.5. В некоторых экспериментах использовали индуктор  $\beta$ -метилксилозид (Serva) (0.3 г/л). В отдельных опытах дрожжи также инкубировали в условиях отсутствия роста в фосфатном буфере (pH 4.0), не содержащем источников углерода и других питательных веществ. Инокулятом служила двухсуточная культура дрожжей, выращенная в среде с 1% глюкозой. Посев производили в расчете  $6 \times 10^8$  кл/мл.

Для изучения локализации  $\beta$ -ксилозидазы клетки в разные периоды роста разрушали на прессе [18]. Соответствующие клеточные фракции получали в виде супернатанта после центрифугирования суспензии (12000g, 20 мин).

Сухую биомассу получали фильтрованием дрожжевых суспензий через мембранные фильтры и высушиванием их до постоянной массы.

Активность  $\beta$ -ксилозидазы определяли в разных клеточных фракциях по количеству *n*-нитрофенола, освобожденного из *n*-нитрофенил- $\beta$ -D-ксилопиранозида (Serva) [2]: 0.1 мл супернатанта (см. выше) инкубировали с 0.5 мл 2.5 мМ раствора *n*-нитрофенил- $\beta$ -D-ксилопиранозида в 50 мМ цитрат-фосфатном буфере (pH 4.0) в течение 20 мин при температуре 50°C. Реакцию останавливали добавлением 4 мл 0.25 М раствора  $Na_2CO_3$ . За 1 ед. акт.  $\beta$ -ксилозидазы принимали такое ко-

личество фермента, которое освобождало при данных условиях из *n*-нитрофенил- $\beta$ -D-ксилопиранозида 1 мкмоль *n*-нитрофенола за 1 мин.

Цифровые данные в статье представляют собой средние величины, полученные в результате трех независимо проведенных друг от друга экспериментов. Средняя ошибка в каждой точке не превышала 10% от среднего арифметического.

Часть работы выполнена в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (г. Пущино). Выражаем признательность за консультации по данной работе Е.Л. Головлёву, О.Н. Окуневу, Н.И. Михалевой, А.В. Боеву (ИБФМ РАН, г. Пущино).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шубаков А.А., Михалева Н.И., Боев А.В., Окунев О.Н. // Прикл. биохим. и микробиол. 1994. Т. 30. С. 812–820.
2. Dekker R.F.H. // Biotechnol. Bioeng. 1983. V. 25. P. 1127–1146.
3. Deshpande V., Lachke A., Mishra C., Keskar S., Rao M. // Biotechnol. Bioeng. 1986. V. 28. P. 1832–1837.
4. Haltrich D., Laussamayer B., Steiner W. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994. V. 42. P. 522–530.
5. Singh A., Kuhad R.C., Kumar M. // Enzyme Microbiol. Technol. 1995. V. 17. P. 551–553.
6. Biely P., Kratky Z., Vrsanska M., Urmanicova D. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 108. P. 323–329.
7. Biely P., Vrsanska M., Kratky Z. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 108. P. 313–321.
8. Flores M.E., Perea M., Rodriguez O., Malvaez A., Huitron C. // J. Biotechnol. 1996. V. 49. P. 179–187.
9. Leathers T.D., Kurtzman C.P., Detroy R.W. // Biotechnol. Bioeng. Symp. 1984. № 14. P. 225–240.
10. Notario V., Villa T.G., Villanueva J.R. // Can. J. Microbiol. 1976. V. 22. P. 312–315.
11. Biely P., Kratky Z., Vrsanska M., Urmanicova D. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 108. P. 323–329.
12. Yasui T., Nguyen B.T., Nakanishi K. // J. Ferment. Technol. 1984. V. 62. P. 353–359.
13. Biswas S.R., Mishra A.K., Nanda G. // Folia Microbiol. 1988. V. 33. P. 355–359.
14. Mandels M., Reese E.T. // J. Bacteriol. 1960. V. 79. P. 816–826.
15. Sternberg D., Mandels G.R. // J. Bacteriol. 1979. V. 139. P. 761–769.
16. Hrmova M., Petrakova E., Biely P. // J. Gen. Microbiol. 1991. V. 137. P. 541–547.
17. Biely P. // Trends Biotechnol. 1985. V. 3. P. 286–290.
18. Рамнер Е.Н., Ушаков В.М., Фухте Б.А. Устройство для экструзионной дезинтеграции микроорганизмов. Дезинтеграция клеток микроорганизмов. Пущино: НЦБИ, 1972. 240 с.

## The $\beta$ -Xylosidase Production by Yeast *Cryptococcus podzolicus*

A. A. Shubakov<sup>#</sup>

*Institute of Physiology, Komi Research Center, Ural Division, Russian Academy of Sciences,  
ul. Pervomaiskaya 50, Syktyvkar, 167610 Russia*

In studying the  $\beta$ -xylosidase production by yeast *Cryptococcus podzolicus* (*Basidiomycetes*), it was shown to be an inducible secretory enzyme. Xylooligosaccharides generated from xylan and methyl  $\beta$ -xyloside were found to induce the  $\beta$ -xylosidase synthesis. The enzyme activity in the medium containing xylan or methyl  $\beta$ -xyloside was 1.0 and 1.5 U/ml, respectively; this production level is similar to that achievable at the  $\beta$ -xylosidase production by mycelial fungi.

*Key words:  $\beta$ -xylosidase, yeasts, *Cryptococcus podzolicus**

---

<sup>#</sup> *To whom correspondence should be addressed; phonelfax: +7 (8212) 42-1001; e-mail: ovoys@physiol.komisc.ru.*

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 8. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.