

STUDY OF CELLULASE ACTIVITY OF TERMITES ON CELLULOSE DEGRADATION

Nazarov Kamoljon Karimovich

Candidate of Biological Sciences Associate Professor Head of the Department "Biotechnology",
Tashkent State Technical University, Uzbekistan, Tashkent

Rakhimov Mirzohid Matnazarovich

Intern-Researcher of the Department of "Biotechnology"
Tashkent State Technical University, Uzbekistan, Tashkent
E-mail: raximovm27@gmail.com

Yangiboyev Yashnarbek Zafarovich

Independent Researcher of the Department "Biotechnology",
Tashkent State Technical University, Uzbekistan, Tashkent

ABSTRACT

Termites play an important role in the degradation of cellulose materials in nature, and special attention is paid to the activity and expression of termite cellulases. The purpose of the research is to study the cellulatic enzyme activity of termites. At the same time, the activity of enzymes from different parts of the body of termites was studied.

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

INTRODUCTION

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.

Termites cause serious damage to wooden structures of cultural and historical monuments, strategic facilities, hydraulic structures, settlements and administrative buildings. One termite family of 25 thousand individuals, living in 100 cm³ of volume, annually consumes on average up to 50 thousand cm³ of various types of cellulose. At the same time, all this leads to the global carbon cycle and an increase in the concentration of the greenhouse gas - carbon dioxide - in the atmosphere. All this is carried out due to the digestive secrets of termites and symbiont enzymes, as well as due to the activity of biochemical processes.

Скрытый образ жизни термитов, сильная защита от экологических факторов окружающей среды, функциональная специализация каст в термитнике и способность в краткие сроки восстанавливать свою популяцию затрудняют применение средств борьбы с ними. Исходя

из этого, определение популяционной экологии термитов и взаимоотношений с позвоночными-беспозвоночными и микроорганизмами, а также разработка современных биологических методов борьбы, контролирующих численность термитов, имеют актуальное значение.

The hidden way of life of termites, strong protection from environmental factors of the environment, the functional specialization of castes in the termite mound and the ability to quickly restore their population make it difficult to use means to combat them. Proceeding from this, the determination of the population ecology of termites and the relationship with vertebrates-invertebrates and microorganisms, as well as the development of modern biological control methods that control the number of termites, are of current importance.

Следует отметить недостаточность научных исследований для защиты населенных пунктов и других сооружений от вреда термитов, причины переселения и распространения термитов из природных условий в урбанизированные экосистемы. В настоящее время весьма актуальными проблемами являются определение распространения популяции термитов, а также физиолого-биохимических процессов, связанных с пищеварительными секретами и активностью ферментов симбионтов, выявление новых видов микроорганизмов-паразитов термитов, совершенствование методов борьбы, основанных на создании ядовитых приманок на основе патогенов-грибов и микроорганизмов.

It should be noted the lack of scientific research to protect settlements and other structures from the harm of termites, the reasons for the resettlement and spread of termites from natural conditions to urbanized ecosystems. Currently, very urgent problems are the determination of the distribution of the termite population, as well as the physiological and biochemical processes associated with digestive secretions and the activity of symbiont enzymes, the identification of new types of termitic parasite microorganisms, the improvement of control methods based on the creation of poisonous baits based on fungal pathogens. and microorganisms.

Термиты имеют специализированную систему переваривания целлюлозы[1]. 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- глюканызы, 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 [2], а целлюлазная активность целлюлаз и их распределение в пищеварительной системе были различными у различных видов термитов.

Termites have a specialized system for digesting cellulose [1]. Various cellulases are involved in cellulose degradation in termites and their symbionts. An important area of research is the study of the cellulase activity of termites. The three main types of cellulases are endo- α -1,4-glucanases, cellobiohydrolases and β -glucosidases, and the degradation of cellulose requires the synergistic action of the three types of glycoside hydrolases. The patterns and characters of cellulases in termites and their symbionts have been widely described [2], and the cellulase activity of cellulases and their distribution in the digestive system were different in different species of termites.

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.

Последние исследования показывают, что распределение целлюлазной активности у термитов связано с их эволюционными уровнями [4,5].

Recently, the distributions of different cellulase activities in each segment of the intestine of termites have been mainly studied, and it has been found that the expression of endogenous cellulase genes has moved from the salivary glands of lower termites to the midgut of higher termites.

Материалы и методы. Термиты. В Узбекистане встречается представители термитов рода *Anacanthotermes turkestanicus*, *Anacanthotermes ahngerianus*. Нашим объектом исследований является термиты рода *Anacanthotermes turkestanicus*. Термиты были привезены из разных областей Узбекистана.

Materials and methods. Termites. In Uzbekistan, there are representatives of the termites of the genus *Anacanthotermes turkestanicus*, *Anacanthotermes ahngerianus*. Our object of research is the termites of the genus *Anacanthotermes turkestanicus*. Termites were brought from different regions of Uzbekistan.

Получение сырого фермента. Для получения ферментных экстрактов рабочие или солдаты промывали предварительно охлажденным 0,09% нормальным физиологическим раствором. 1 образец - пятнадцать комплектов головок (включая слюнные железы), 2 образец – грудной и брюшной отдел тела термита, 3 образец целое тело термитов. Всех образцов собирали в пробирки и гомогенизировали в 500мл 0,1 М ацетатно-натриевого буфера (САБ) (рН 5,6) на льду. Пробирки центрифугировали при 12000 об / мин в течение 15 мин при температуре 4 °С, а супернатанты доводили до объема 500 добавлением 0,1 М САБ и использовали в качестве ферментного экстракта. В качестве контроля использовали тот же объем 0,1 М САБ.

Obtaining a crude enzyme. To obtain enzyme extracts, workers or soldiers were washed with pre-cooled 0.09% normal saline. 1 sample - fifteen sets of heads (including salivary glands), 2 sample - thoracic and abdominal part of the termite body, 3 sample whole body of termites. All samples were collected in test tubes and homogenized in 500 ml of 0.1 M sodium acetate buffer (SAB) (pH 5.6) on ice. The tubes were centrifuged at 12000 rpm for 15 min at 4 °C, and the supernatants were brought to a volume of 500 by adding 0.1 M SAB and used as an enzyme extract. The same volume of 0.1 M SAB was used as a control.

Анализ активности целлюлазы. В двух пробирках суспензировали по 50 мг окрашенного субстрата в 4 мл 0,1 М ацетатного буфера (рН=4,5) при 400С, перемешивая на магнитной мешалке 5 мин. Затем в одну пробирку добавляли 0,1 мл раствора, содержащего 2-6 мг ферментного препарата, продолжая перемешивать.

Cellulase activity analysis. In two test tubes, 50 mg of the colored substrate were suspended in 4 ml of 0.1 M acetate buffer (pH = 4.5) at 400C, stirring on a magnetic stirrer for 5 min. Then, 0.1 ml of a solution containing 2-6 mg of the enzyme preparation was added to one tube, while continuing to stir.

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:

To another tube was also added 0.1 ml of the indicated enzyme preparation solution, and the contents were quickly passed through a filter (control). In 20 minutes. the reaction mixture in the first tube was passed through a filter and the optical density of the filtrate was determined at a wavelength of 490 nm for OTs-31 and 375 nm for REC-OX against the control sample.

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

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.

where D is the optical density of the hydrolyzate, M is the mass of the enzyme preparation taken for analysis.

The activity of such an amount of enzyme, which forms 1 unit, was taken as a conventional unit of activity. optical density at 500, 490, 410 or 375 nm (depending on the type of dye) in 20 min.

Таблица 1. Полная целлюлазная активность разных частей тела у испытуемых рабочих-термитов.

Table 1. Total cellulase activity of different parts of the body in test termite workers.

№	Termite body parts	After 1 hour	48 hours	72 hours
1	Termite	7,4	3,9	3,2
2	Head department of termite	4,7	4,2	4,2
3	Thoracic and abdominal termite	10,5	10	9,5

Фильтровальная бумага градуировочная активность. Мы провели сравнительное определение активности из трех отделов тела термитов сырых ферментов по отношению к фильтровальной бумаги, которую определяли по образованию глюкозы и восстанавливающих сахаров методом Шомоди – Нельсона [6]. За единицу активности принимали количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкМ ВС за 1 мин из

соответствующего субстрата. На таблице 1 и рисунке 1 представлены результаты этих экспериментов, из которых видно, что наиболее активной оказалась образцы грудно-брюшной части тела термитов.

Filter paper calibration activity. We carried out a comparative determination of the activity of crude enzymes from three parts of the termite body in relation to filter paper, which was determined by the formation of glucose and reducing sugars by the Shomody-Nelson method [6]. A unit of activity was defined as the amount of enzyme that leads to the formation of 1 μM VS in 1 min from the corresponding substrate. Table 1 and Figure 1 show the results of these experiments, from which it can be seen that the samples of the thoracic-abdominal part of the body of termites turned out to be the most active.

Для подбора оптимальных параметров гидролиза были проведены эксперименты по гидролизу при pH 5,0 среды и температуры 55 – 60 °C. Начальная скорость ферментативного гидролиза существенно зависит от степени адсорбции ферментов на субстрате. В ряде случаев начальную скорость реакции можно увеличить добавляя поверхностно активные вещества (ПАВ), которые увеличивают смачиваемость целлюлозы, а соответственно и биодоступность её для ферментов.

To select the optimal hydrolysis parameters, experiments on hydrolysis were carried out at pH 5.0 of the medium and temperature 55 - 60 °C. The initial rate of enzymatic hydrolysis significantly depends on the degree of adsorption of enzymes on the substrate. In some cases, the initial reaction rate can be increased by adding surfactants (surfactants), which increase the wettability of cellulose, and, accordingly, its bioavailability for enzymes.

Мы провели исследование начальной скорости ферментативной реакции по выходу глюкозы при добавлении различных концентраций ПАВ Тритона X-100. Наиболее эффективно увеличивает начальную скорость ферментативного гидролиза 0,5% Тритон X-100. Более высокие концентрации Тритона X-100 эффекта не дают.

We conducted a study of the initial rate of the enzymatic reaction in terms of glucose yield when adding various concentrations of the surfactant Triton X-100. Triton X-100 0.5% increases the initial rate of enzymatic hydrolysis most effectively. Higher concentrations of Triton X-100 have no effect.

Во втором этапе наших исследований было запланировано решать задачи в которой входили приготовление суспензий головного, грудно-брюшного и целого тело термитов, в данном разделе были определены биodeградуемость фильтровальной бумаги при действие суспензии полученных из разных частей тело термитов оптимальное соотношение-не фильтровальная суспензия 1,2,3; фильтровальная (центрифугированная) суспензия 4,5,6; и 7 чистый ферментный препарат (контроль).

In the second stage of our research, it was planned to solve problems that included the preparation of suspensions of the head, thoracic-abdominal and whole body of termites, in this section, the biodegradability of filter paper was determined under the action of a suspension obtained from different parts of the termite body, the optimal ratio is a non-filter suspension 1.2 , 3; filter (centrifuged) suspension 4,5,6; and 7 pure enzyme preparation (control).

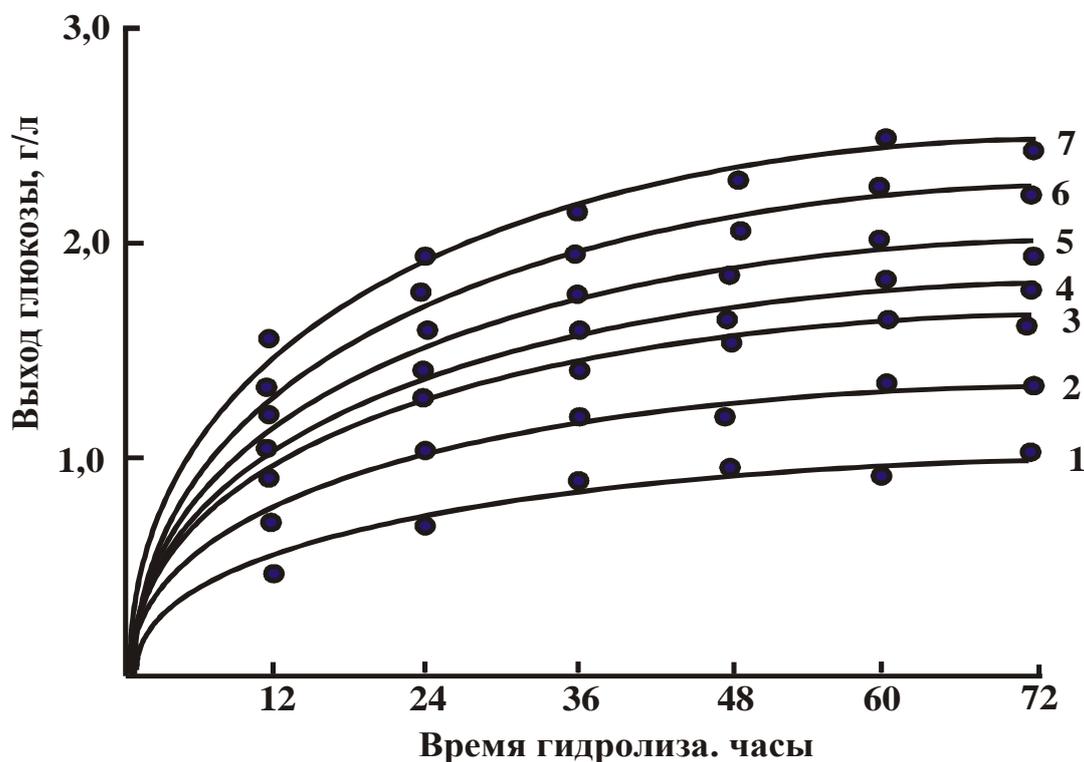


Рис. 1. Выход глюкозы (г/л) при ферментативном гидролизе фильтровальной бумаги с помощью различных суспензии полученных из разных части тело термитов: образец I, образец II, образец III.

Rice. 1. The yield of glucose (g / l) during enzymatic hydrolysis of filter paper using various suspensions obtained from different parts of termites: sample I, sample II, sample III.

1 – не фильтровальная суспензия целого тело термитов; 2 – не фильтровальная суспензия головного отдела термитов; 3 – не фильтровальная суспензия грудно-брюшного отдела термитов; 4 – фильтровальная (центрифугированная) суспензия целого тело термитов; 5 – фильтровальная (центрифугированная) суспензия головного отдела термитов; 6 – фильтровальная (центрифугированная) суспензия грудно-брюшного отдела термитов; 7 – чистый ферментный препарат (контроль).

1 - non-filtering suspension of the whole termite body; 2 - non-filtering suspension of the head section of termites; 3 - non-filtering suspension of the thoracic-abdominal termites; 4 - filter (centrifuged) suspension of the whole termite body; 5 - filter (centrifuged) suspension of the head section of termites; 6 - filter (centrifuged) suspension of the thoracic-abdominal termites; 7 - pure enzyme preparation (control).

Обсуждение. Термиты играют важную роль в деградации целлюлозных материалов в природе, и особое внимание уделяется активности и экспрессии термитных целлюлаз [2]. Эффективное переваривание целлюлозы у термитов требует как эндогенных, так и кишечных микробных целлюлаз. Настоящее исследование показало, что грудная и брюшной часть является основным местом переваривания целлюлозы у термитов, что согласуется с сообщением.

Discussion. Termites play an important role in the degradation of cellulosic materials in nature, and special attention is paid to the activity and expression of termite cellulases [2]. Efficient cellulose digestion in termites requires both endogenous and intestinal microbial cellulases. The present study showed that the chest and abdomen are the main digestion site for cellulose in termites, which is consistent with the report.

Что касается динамического сдвига у термитов, то наши результаты показали, что активность ЭГ 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 [7], 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.

As for the dynamic shift in termites, our results showed that the activity of EG and the degrading activity of filter paper were most strongly concentrated in the intestines of the studied termites than in other samples (body parts, samples I and II) of termites, which confirms the studies of EG [7], the dynamic change in cellulase activity is confirmed by the corresponding report by Fujita A., T. Miura, T. Matsumoto (2008) and Tokuda G (2009). They hypothesized that the main position of activity to the head / foregut with the evolution of arboreal termites, and evolved arboreal termites such as the Rhinotermitidae and Termitidae, may have higher BG activity in the thoracic part of the termite.

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.

Regarding the comparison of cellulase activity in whole termite bodies, it has been suggested that the degrading activity of filter papers and the percentage of СВН in complete cellulases increase with an average increase in evolutionary status.

Полученные данные показывают что (Рис. 1.) полученные суспензии от разных мест тело термитов после фильтрацию наибольшее гидролизуют целлюлозу в виде фильтровальной бумаги, чем суспензии без фильтрацией это тоже доказывают что имеющие разных веществ в составе субстрата отрицательно влияет на биodeградацию образцов целлюлозы (в виде фильтровальной бумаги).

The obtained data show that (Fig. 1.) the obtained suspensions from different places of the termite bodies after filtration hydrolyze cellulose in the form of filter paper to the greatest extent than suspensions without filtration. filter paper).

Из полученных данных даёт возможность сделать вывод в том что термиты в грудной и брюшной части, целлюлазная активность термита постепенно уменьшается. Эту явление можно объяснить тем что в составе полученной суспензии имеются разные примеси и они могут влиять на целлюлазную активность, так как не однократно было доказано что на

активность целлюлазы могут влиять мультиномиальные факторы, такие как температура, субстрат, состояние и состав субстрата[3].

From the data obtained, it is possible to conclude that the termite in the thoracic and abdominal parts, the cellulase activity of the termite is gradually decreasing. This phenomenon can be explained by the fact that the resulting suspension contains different impurities and they can affect the cellulase activity, since it has been proven more than once that multinomial factors such as temperature, substrate, state and composition of the substrate can influence the cellulase activity [3] ...

LITERATURE

- 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 293-294. Малькин В.К.ю Мазур Т.М., Бершова и др.
- 7) Lo N., G. Tokuda, H. Watanabe 2011. Evolution and function of endogenous termite cellulases. In: D.E. Bignell et al. (eds.), Biology of Termites: a modern synthesis, pp.51- 67. Springer Science+Business Media, London New York.