

УДК 577.151.62

**Л. Д. Варбанець, Н. В. Борзова**

Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП Д03680, Україна, тел.: 8 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

## КСИЛАНАЗИ МІКРООРГАНІЗМІВ

*У статті наведені дані щодо ксиланаз – ферментів, які беруть участь в розщепленні природних полісахаридів, зокрема ксиланів. Показано, що в залежності від походження, структура і хімічний склад ксиланів в значній мірі варіюють, що обумовлює участь в їх розщепленні, крім ксиланаз, і інших ферментів, таких як арабінофуранозідази,  $\beta$ -глюкуронідази, естерази. Показано, що здатність продукувати ферменти, які деградують ксилан, притаманна грибам, актиноміцетам і еубактеріям. Ксиланози різного походження відрізняються фізико-хімічними властивостями, субстратною специфічністю. Показана можливість застосування ксиланаз у целюлозо-паперовій і харчовій промисловості, у виробництві хліба, напоїв, текстилю.*

*Ключові слова: ксиланози, мікроорганізми, субстратна специфічність, фізико-хімічні властивості, практичне застосування.*

Наявність великих ресурсів целюлози і геміцелюлози в рослинній біомасі робить все більш актуальною проблему залучення рослинних відходів сільського господарства і промисловості в процеси мікробної конверсії для отримання харчового і кормового білка і фізіологічно активних речовин. Від 20 до 40 % від сухої ваги сільськогосподарських відходів складає ксилан, який разом з геміцелюлозою утворює другий найбільш широко розповсюджений в біосфері полісахарид, здатний до відновлення. Було оцінено, що 500 млн тон таких матеріалів можуть бути щорічно доступні тільки від залишків головних зернових культур. Тому розвиток малокоштовних технологій, які ґрунтуються на геміцелюлозі, викликає інтерес у дослідників. Ймовірно, в недалекому майбутньому, ксилан в комбінації з целюлозою забезпечить більшість світових потреб в сировині. Можливо передбачити, що в наступні 50 років вугілля та неочищена нафта будуть замінені біомасою. В багатьох технологічних процесах, перш за все при виробництві паперу та целюлози, ксилан є небажаним домішкою, і повстає проблема його деградації. Необхідно гідролізувати ксилан також в деяких процесах харчової і кормової промисловості, при комплексній переробці рослинних відходів. Гідроліз ксилану може бути здійснений за допомогою хімічних реагентів або ферментативним шляхом. Ферментативний гідроліз є переважливим, оскільки менш впливає на структуру інших волокон і утворюється менше хімічних відходів. В харчовій або кормовій промисловостях хімічний гідроліз взагалі неприйнятний.

© Л. Д. Варбанець, Н. В. Борзова, 2008



Для мікробного гідролізу ксилану необхідна дія таких ферментів, як  $\beta$ -1,4-ксилазази і  $\beta$ -ксилозидази. Ендо-1,4- $\beta$ -D-ксилаза або 1,4- $\beta$ -D-ксилаза ксиланогідролаза (КФ 3.2.1.8) — фермент, який здійснює неупорядкований гідроліз внутрішньомолекулярних ксилозидних зв'язків ксиланів або ксилоолігосахаридів. Високомолекулярні ксилани мають перевагу для дії ферменту в порівнянні з олігомерними ланцюгами, швидкість гідролізу яких знижується зі зменшенням ступеня полімерізації. Другий фермент, який бере участь в розщепленні ксиланів, — екзо-1,4- $\beta$ -D-ксилозидаза (КФ 3.2.1.37) або  $\beta$ -ксилозидаза, яка каталізує гідроліз олігосахаридів шляхом послідовного відщеплення залишків D-ксилози з нередукуючого кінця. Встановлено, що активність ксилозидази найбільша по відношенню до ксилобіози і зменшується зі збільшенням довжини ланцюга субстрата.

Джерелами ксиланаз можуть бути безхребетні тварини, вищі рослини, насіння, морські водорості, але найбільш технологічними є мікроорганізми — гриби, бактерії, дріжджі [1]. Мікробні ксиланози завдяки їх високій специфічності, м'яким умовам реакції, незначним витратам субстрата і утворенню побічних продуктів, є найбільш перспективними каталізаторами для гідролізу ксилану. Але вартість ферментативного гідролізу біомаси є одним з факторів, який лімітує економічну доцільність процесу. Продукція ксиланаз тим не менш може бути покращена знаходженням більш потужних штамів грибів або бактерій, або одержанням мутантних штамів, здатних продукувати значну кількість ферментів, або і те, і інше. Більшість бактерій і грибів продукують позаклітинні ксиланози, які діють на геміцелюлозний матеріал зі звільненням ксилози, як кінцевого продукту, що здатний безпосередньо асимілюватися, тим самим дозволяючи організму рости гетеротрофно на ксилані. Мікроорганізми рубця жуйних тварин, як відомо, є потенційними продуцентами ксиланаз, можливо завдяки високому вмісту геміцелюлозу в харчуванні жуйних тварин.

В сучасній промисловості використовуються ксиланози бактеріального та грибового походження. Більшість грибних ксиланаз належить до 10-ої і 11-ої родини глікозил-гідролаз, які відрізняються за фізичними властивостями, субстратною специфічністю і оптимумом рН. Деякі гриби містять гени, які кодуєть декілька різних ксиланаз, які належать як до одного, так і до різних родин, і синтезують декілька ксиланаз одночасно. На сьогодні ідентифіковано принаймні 89 різних родин глікозил гідролаз. Ксиланози відносяться до 10 і 11 родин. Ферменти родини 10 мають упаковку  $(\alpha/\beta)_8$  бочечок, в той час як члени родини 11 характеризуються  $\beta$ -гелевою упаковкою. Психрофільні ксиланози, на основі первинної структури можуть бути віднесені до родини 8, проявляючи на 20–30 % подібну послідовність з її членами. Родина 8 головним чином включає ендоглюканази (ЕС 3.2.1.4), а також хітозанази (ЕС 3.2.1.132) і ліхенази (ЕС 3.2.1.73).

### **Структура ксилану**

В залежності від походження, структура і хімічний склад ксилана в значній мірі варіює, але в будь-якому випадку, коровий ланцюг утворений  $\beta$ -1,4-зв'язаними залишками D-ксилози. Він може бути або незаміщений, як в ксиланах оболонки насіння гуару, альфа еспарти, стебел тютюну, у вигляді гомополімерів або арабіноксиланів, глюкуроноксиланів і глюкуроноарабіноксиланів. Але в кожній категорії існує мікрогетерогенність, обумовлена ступенем та природою розгалуження. Так, гомополімерний коровий ланцюг з 1,4-зв'язаних  $\beta$ -D-ксилопіранозних залишків може бути заміщений при C-2 і C-3 положеннях



О-ацетильними групами, залишками  $\alpha$ -L-арабінофуранози,  $\alpha$ -1,2-зв'язаною глюкуроною або 4-О-метилглюкуроною кислотами [10]. Ксилани дерев містять як О-ацетил-4-О-метилглюкуроноксилани в твердій деревині, так і арабіно-4-О-метил глюкуроноксилани в м'якій деревині. Ступінь полімеризації ксиланів в твердій деревині (150-200) вище, ніж в м'якій (70-130). Ксилани злакових містять D-глюкуронову кислоту і/або її 4-О-метильний ефір та арабінозу. Арабіноксилани ендосперму річних рослин, пентозани, більш розчинні у воді і лугах, ніж ксилани лігноцелюлоз внаслідок їх розгалуженої структури [18].

Внаслідок такої гетерогенності ксилану, для повної деградації полісахаридів необхідний складний спектр ферментів. Головний компонент комплексу утворений ендо- $\beta$ -1,4-ксиланазами, тобто так званими ксиланазами, які гідролізують корову частину до немодифікованих залишків. Для розщеплення бокових ланцюгів, крім ксиланаз, потрібний достатньо широкий спектр ферментів, таких як арабінофуранозидази,  $\beta$ -глюкуронідази, естерази, але для більшості технологічних процесів достатньо дії ферменту, який розщеплює головний ланцюг ксилану — ендо- $\beta$ -1,4-ксиланазу. О-ацетильні групи, присутні при С-2 і С-3 положеннях залишків ксилози, заважають ксиланазам повністю деградувати ацетилксилан, ймовірно за рахунок стеричної перешкоди. Синергічна дія ацетилксилан естераз і ксиланаз є суттєвою для повного гідролізу ацетилксиланів. На структурі деяких ксиланів було показано присутність незначної кількості феруоїль- і *n*-курамоїльних кислот, які приєднані через залишки L-арабінози. Ці кислоти приєднані до С5 залишка арабінози. В багатьох випадках була показана присутність ковалентного зв'язку між лігніном і геміцелюлозою через замісники ксилану. Було доведено наявність етерних зв'язків між арабінозою і лігніном [53] і глюкуроною кислотою і лігніном [12]. Феруоїльні групи також можуть перехресно зв'язувати ксилан і лігнін [48]. Бокові ланцюги визначають розчинність, фізичну конформацію і реактивність молекули ксилану з іншими целюлолітичними компонентами, і тому значною мірою впливають на спосіб і ступінь ферментативного розщеплення.

Була описана трьохвимірна структура молекул ксилана [6] і показано, що в кристалічних умовах кор ксилану має лівозавернуту потрійну геліксову конформацію. На геометрію глікозидного зв'язку бокові ланцюги не впливають. Дослідження полісахаридів свідчать, що кор використовує взаємозв'язки між ланцюгами, що визначає кінцеву конформацію. Електронною дифракцією також підтверджено потрійну конформацію і показано, що ланцюги організовані в тригональні ґрати з гексагональною морфологією. Єдиний замісник водню при положенні 5 ксилозного кільця має вирішальний вплив на взаємодію внутрішньо- та міжланцюгових зв'язків. На основі підрахунку енергії можна припустити, що ксилозне кільце існує в загальній  ${}^4C_1$  конформації крісла, що вказує на те, що в обох 1-4 та 1-3 глікозидно зв'язаних ксиланах зв'язок є дієкваторіальним (1e-4e). Внутрішньоланцюговий водневий зв'язок О (2')... О (6) підсилює О (3)... О (5') водневий зв'язок для того, щоб підтримати подвійну геліксову структуру, подібну стрічці, і О (6) Н водневого зв'язку в О (3) атоми в сусідніх ланцюгах з утворенням простирадла [6]. З цих досліджень витікає концепція щодо того, що глікозидний зв'язок геометрично підтримує основну конформацію. Дані щодо тривимірної конформації ксилану у водному оточенні можуть бути надзвичайно важливими в розумінні взаємодій ксилану і ксиланазу.



### Продукція ксиланази

Відомо багато мікроорганізмів, які здатні продукувати ферменти, що деградують ксилан — гриби, актиноміцети і еубактерії. Основними факторами, необхідними для ефективної продукції ксиланолітичних ферментів, є вибір відповідного індукуючого субстрату і оптимальний склад поживного середовища. Важливість вільних від целюлаз ксиланазних систем в паперовій промисловості було поштовхом для досліджень в кореляції продукції ксиланаз і целюлаз мікроорганізмами. Нитчасті гриби є надзвичайно цікавими продуцентами ксиланаз, оскільки вони виділяють ферменти в середовище і рівні ферментів значно вищі, ніж такі дріжджів і бактерій. Але грибні ксиланози зазвичай асоційовані з целюлазами. Селективна продукція ксиланаз можлива при вирощуванні видів *Trichoderma* і *Aspergillus* на ксилані як єдиному джерелі вуглеводу. Вирощування на целюлозі приводить до продукування обох ферментів, як целюлаз, так і ксиланаз, що може бути обумовлено присутністю слідових кількостей геміцелюлози в целюлозних субстратах. На механізми, які керують утворенням позаклітинних ферментів в залежності від джерела вуглецю, який присутній в середовищі, впливає доступність попередників білкового синтезу. Тому у деяких грибів, які ростуть на ксилані, не забрудненому целюлозою, при низьких співвідношеннях азот/вуглець в середовищі можуть продукуватися ксиланолітичні ферменти, які вільні від целюлаз. Однак, встановлено, що целюлозолітичні субстрати є необхідними для максимальної продукції ксиланози *Thermomonospora curvata* [49], *Neurospora crassa* [15], *Clostridium stercorarium* [8]. Як було встановлено [36], дешеві геміцелюлозні субстрати, такі як кукурудзяні качани, пшеничні і рисові висівки, рисова солома, кукурудзяні стебла є найбільш придатними для утворення ксиланаз такими мікроорганізмами як *Aspergillus awamori*, *Penicillium purpurogenum* [28], *Bacillus sp. MCIB 59* [16]. Найбільш повно охарактеризовано ксиланози *Aspergillus fumigatus* і *Trichoderma reesei* [3], причому остання проявляє максимальну серед грибів активність ( $3350 \text{ MO} \cdot \text{мл}^{-1}$ ) [26, 36].

Схема очистки ендо-(1-4)- $\beta$ -ксиланози з культуральної рідини 3-х добової культури *Geotrichum candidum* ЗС була розроблена дослідниками [2]. Внаслідок очистки в 23 рази підвищена питома активність ендоксиланози, яка становила  $32,6 \text{ E/мг}$  білка, вихід активності — 14,4 %. Показана гомогенність ферменту при електрофорезі в ПААГ в присутності ДДС-натрію і визначена молекулярна маса — 60-67 кДа. Оптимальне значення рН при дії на карбоксиметилксилан (віскозиметричне визначення) 4,0, рН — 3,4. Фермент стабільний при рН 3,0—4,5 та 30—5 °С протягом 1 год. Максимальна осахарююча активність по відношенню до ксилану з деревини берези, зерна жита, пшеничної соломи була 10, 12 і 7,7 %, відповідно за 72 год, при концентрації ендоксиланози 0,2 мг/мл. Ступінь гідролізу ксилану з деревини берези при концентрації фермента 0,4 мг/мл — 20 %. Початкові продукти гідролізу ксилану з деревини берези — ксилоолігосахариди зі ступінем полімерізації більше 4, кінцеві продукти — ксилобіоза, ксилотріоза, ксилоза і кислі ксилоолігосахариди.

Максимальна ксиланазна активність при ферментації на твердих середовищах була одержана для гриба *Schizophyllum commune* ( $22700 \text{ MO} \cdot \text{г}^{-1}$ ), в той час як *Trichoderma hamatum* продукує  $7000 \text{ MO} \cdot \text{г}^{-1}$  при використанні соломи пшениці як субстрату [25].

Ряд *Bacillus spp.* [16] і гриби [23] продукують ксиланози, вільні від целюлаз. Здатність продукувати ксиланазу при ферментації на твердих середовищах показана



для *Bacillus licheniformis* [5]. Твердофазна ферментація нагадує природне мешкання мікроорганізмів і тому може бути ефективною в продукуванні деяких ферментів і метаболітів.

Хоча описано багато штамів, що продукують ксиланази, застосування для комерційного продукування на сьогодні обмежено, головним чином, *Trichoderma spp.* і *Aspergillus spp.* [28].

Дослідниками ідентифіковано ряд штамів, які продукують ксиланазу у великій кількості з підвищеною стабільністю при екстремальних умовах рН і температури. Так, з компостів ізолювано термофільний гриб *Melanocarpus albomyces*, який при вирощуванні в рідкому середовищі, яке містило цукровий очерет, продукував ксиланазу, вільну від целюлази [45]. Гриб був незвичайний, тому що ксиланазна активність індукувалась як геміцелюлозними субстратами, так і ксилозою, але не глюкозою. Шляхом фільтрації за молекулярною масою, а також іонообмінною хроматографією було одержано 4 ксиланази. Використовуючи такі ж самі умови очистки, було показано, що ксиланаз 1 не утворювалась при вирощуванні гриба на середовищі з ксилозою. Два фермента, мінорну ксиланазу ІА і основну ксиланазу ІІА, було очищено до гомогенного стану при вирощуванні продуцента на середовищі з цукровим очеретом. Обидві ксиланази були специфічні до полімеру  $\beta$ -1,4-ксилози, оптимуми активності були відповідно при рН 6,6 і 5–6 і температурі 65 °С. Ксиланази були стабільні між рН 5 і 10, при 50 °С протягом 24 год. Ксиланази звільняли з ксилану різного походження ксилобіозу, ксилотріозу і більш високомолекулярні олігомери.

На відміну від характерних для грибних ксиланаз кислих значень рН [7], актиноміцети і бактерії характеризуються близькими до нейтральних значеннями рН-оптимуму для росту і утворення ферменту. Так, з позаклітинного ферментативного комплексу *Bacillus polymyxa* [41] очищено до гомогенного стану 3 ендоксиланази ( $X_{34}C$ ,  $X_{34}E$  і  $X_{22}$ ) з низькими молекулярними масами: 34, 34 і 22 кДа і лужними значеннями рІ — 9,3, >9,3 і 9,0, відповідно.  $X_{34}C$  і  $X_{34}E$  близькоспоріднені і є ізоформами одного і того ж ферменту. Три ферменти відрізняються деякими характеристиками, зокрема оптимумами рН і температури. Один з них,  $X_{34}E$ , характеризується високою термостабільністю. Значення  $V_{max}$  для  $X_{34}C$ ,  $X_{34}E$  і  $X_{22}$  ферментів на ксилані вівса складають 14,9, 85,5 і 64,0  $O \cdot mg^{-1}$ , відповідно, та 16,1, 62,0 і 150,6  $O \cdot mg^{-1}$ , відповідно, на ксилані березових дерев. Коли як субстрат використовували ксилан вівса, значення  $K_m$  склали 3,4, 2,4 і 1,9  $mg \cdot ml^{-1}$  для  $X_{34}C$ ,  $X_{34}E$  і  $X_{22}$  ферментів, відповідно, та 0,65, 6,3 і 0,32  $mg \cdot ml^{-1}$  значення  $K_m$  склали при використанні як субстрату ксилану березових дерев. Ферменти відносяться до ендоксиланаз, які не діють на розгалужені замісники. Ксилоза була єдиним продуктом гідролізу ксилану ксиланазами  $X_{34}C$  і  $X_{34}E$ , але цей моносахарид не звільнявся під дією  $X_{22}$  ферменту. Однак, жоден з ферментів не був здатним деградувати ксилобіозу. Ксиланази  $X_{34}C$  і  $X_{34}E$  є новими ферментами, в той час як  $X_{22}$  відповідає вже описаним раніше ксиланазам бацил.

Ферменти актиноміцетів представляють практичний інтерес, тому що вони є термостабільними. Дослідники [47] ізолювали з ґрунтів Єгипту 2 штами — *Streptomyces albus* і *Streptomyces chromofuscus*, які проявили максимальну ксиланазну активність (13,25, 19,31 і 32,53, 43,01) на необробленій і обробленій  $TiO_2$  рисовій соломі, відповідно. Активність підвищувалась, коли обидва ферменти вирощували на дріжджовому екстракті. Оптимальна продукція ксиланаз спостерігалась після 5 днів ферментації. Ксиланаз *Streptomyces chromofuscus* проявляла більшу відбілюючу



активність в порівнянні з ферментом *S. albus*. Вона підвищувала вивільнення редуруючих сахарів, які покращували здатність паперу до відбілювання.

Ендоксилазанний комплекс зі *Streptomyces sp.* B-12-2 був очищений і охарактеризований [17]. Встановлено, що при вирощуванні на ксилані пшениці стрептоміцет утворює 5 різних ксиланаз при відсутності значної активності целюлаз. На основі фізико-хімічних властивостей, ксиланазі можуть бути поділені на 2 групи: перша (хул 1a і хул 1b) включає ксиланазі з низькою молекулярною масою (26,4 і 23,8 кДа, відповідно), з рІ 6,5 і 8,3, відповідно. Ендоксилазані групи 1 нездатні гідролізувати арил- $\beta$ -D-целобіозид, характеризуються низькою активністю щодо ксилотетраози ( $X_4$ ) і обмеженою активністю щодо ксилопентаози, продукують мало або зовсім не продукують ксилозу і утворюють продукти, які мають високий рівень полімеризації зі складними субстратами. Ці ферменти, ймовірно, здійснюють трансглікозилювання. Друга група (хул 2, хул 3 і хул 4) включає ксиланазі з високою молекулярною масою (36,2, 36,2 і 40,5 кДа, відповідно) і низькими значеннями рН (5,4, 5,0 і 4,8, відповідно). Ендоксилазані групи 2 гідролізують арил- $\beta$ -D-целобіозид, проявляють високі рівні активності відносно  $X_4$ , повністю гідролізують ксилопентаозу з утворенням ксилобіози і ксилотріози, а також обмежену кількість  $X_4$  і ксилози. Незважаючи на внутрішньогрупову подібність, кожний фермент проявляє унікальну дію і фізико-хімічні властивості. Встановлено, що хул 2 є високоглікозилюваною, а хул 1b повністю пригнічується *n*-гідроксимеркурібензоатом.

Більшість відомих на сьогодні ксиланаз проявляють оптимум активності при 50 °С або нижче і при кислих або нейтральних значеннях рН. З іншого боку, в процесі ферментативного відбілювання паперу необхідно, щоб ксиланазі працювали при підвищеній температурі і лужних значеннях рН [63], що робить використання термостабільних лужних ксиланаз більш привабливим. На сьогодні відомо декілька ксиланаз, які активні і стабільні при лужних значеннях рН і підвищеній температурі [42]. Так, дві ксиланазі — XylA і XylB були очищені з культуральної рідини алкаліфільного штаму *Bacillus sp.* AR-009 [20]. Молекулярні маси обох ферментів склали 23 кДа (XylA) і 48 кДа (XylB). Оптимум рН для XylA був 9 і для XylB — 9 і 10. Оптимальною температурою для активності XylA була 60 °С при рН 9 і 70 °С при рН 8. XylB проявляла оптимальну активність при 75 °С при рН 9 і 70 °С при рН 8. Обидва ферменти були стабільні в широкому спектрі рН і проявляли стабільність при інкубації при 60 і 65 °С при рН 8 і 9. Оптимум рН більшості відомих ксиланаз падає із підвищенням температури. XylB *Bacillus sp.* AR-009, ймовірно, є унікальною, тому що має лужний рН оптимум при підвищеній температурі. Подальші дослідження цього ферменту можуть надати інформацію щодо молекулярних основ стабільності і активності ксиланаз при цих умовах.

Накатура et al. [42] повідомили щодо продукції *Bacillus sp.* TAR-1 лужної ксиланазі, яка характеризується оптимумом температури 70 °С при рН 9 і 75 °С при рН 7.

Ферменти психрофільних організмів відрізняються від мезофільних більш низькою термостабільністю, але більш високою специфічною активністю при низьких і помірних температурах. Сучасна думка щодо цього питання полягає в тому, що вони мають підвищену здатність до пристосування, яка сприяє конформаційним змінам, необхідним для активності при низьких температурах, підвищуючи пристосованість і трансформацію субстратів при низьких енергетичних витратах. Вони характеризуються підвищеним числом обертів і фізіологічною



ефективністю ( $k_{cat}/K_m$ ) при низьких і помірних температурах, а також більш низькою стабільністю. Дослідники [44] навели структуру ксиланази антарктичної бактерії *Pseudoalteromonas haloplanktis* при 1,3 А°. Конформація її відрізняється від відомих ксиланаз і може бути описана як  $(\alpha/\alpha)_6$  бочечка. Дослідження різних параметрів, які можуть пояснити наявність адаптованих до холоду білків, показало, що білок характеризувався зменшеною кількістю сольових містків і підвищеною експозицією гідрофобних залишків. Кристалічні структури комплексу з ксилобіозою були одержані при розділенні 1,2 А°. Аналіз різних субстратзв'язуючих сайтів свідчить, що +3 і -3 перебудовуються в порівнянні з родиною 8, в той час як ксилобіозний комплекс припускає наявність +4 субсайта. Зменшена кислотність субстратзв'язуючої ділянки і підвищена гнучкість ароматичних залишків, які покривають субсайт, можуть підвищити швидкість, при якій субстрат зв'язується. Знання структур психрофільних ферментів може забезпечити розуміння того, як їх стабільність при вищих температурах може бути покращена, в той час як їх здатність до пристосування в більш холодних умовах оточуючого середовища зберігається — ознака, яка робить їх корисними для багатьох біотехнологічних використань.

Психрофільна ксиланаза гідролізує ксилан до ксилотріози ( $X_3$ ) і ксилотетраози ( $X_4$ ) і, на відміну від ідентифікованих на сьогодні ксиланаз, діє шляхом інверсії аномерної конфігурації. Активність ферменту відносно  $X_5$  надзвичайно низька, в той час як каталітична ефективність по відношенню до  $X_6$  надзвичайно висока, що вказує на те, що фермент має значний субстратзв'язуючий сайт, який містить принаймні 6 ксилозозв'язуючих субсайтів.

Для мікробних ксиланаз характерна наявність однією субодиниці в білковій молекулі і їх молекулярні маси варіюють від 8 до 145 кДа [50]. Оптимальна температура для бактеріальних і грибних ксиланаз складає 40-60 °С. Грибні ксиланази менш термостабільні, ніж бактеріальні. Разом з тим, *Ceratocystis paradoxa*, мезофільний організм, продукує ксиланазу, яка стабільна протягом 1 год при 80 °С [13]. D-ксиланази, одержані з різних організмів, звичайно стабільні при широкому спектрі значень рН (3-10) і мають оптимум рН при 4-7. Ксиланази грибів, таких як *Aspergillus kawachii* [30], *Penicillium herque* [19] проявляють оптимум рН в кислій зоні (2-6). Ізоелектричні точки для ендоксиланаз різного походження варіюють від 3 до 10. Відомо, що бактерії здатні продукувати дві ксиланази — високомолекулярну кислоту і низькомолекулярну — лужну. Але такий тип взаємовідносин не є характерним для грибів, більш характерним для них є продукція низькомолекулярних лужних ксиланаз. Вивчення амінокислотного складу свідчить, що ксиланази різного походження містять як домінуючі аспарагінову, глютамінову кислоти, гліцин, серин і треонін.

Синтез глікозилізованих ксиланаз складає загальне явище серед багатьох еукаріотних продуцентів [19]. Ксиланази прокаріотів, таких як *Clostridium sporiarium* [8], *Streptomyces sp.* [38], алкаліфільний, термофільний штам *Bacillus sp.* [16] є глікопротеїнами. Вуглеводні групи ковалентно приєднані до білка або присутні у вигляді комплексів, здатних до дисоціації. Глікозилування сприяє стабілізації гліканаз в екстремальних умовах оточуючого середовища. Рекombінантні ксиланази, експресовані в *Escherichia coli* [39] з алкаліфільного, термофільного штаму *Bacillus sp.* [35] проявляли меншу стабільність при високій температурі і меншу здатність до зв'язування з ксиланом в порівнянні з ксиланазами вихідного



штаму, для яких властиво відсутність глікозилювання. В складі ксиланаз *Talaromyces byssochlamydoideus* УН-50 присутні залишки манози, глюкози і фукози [62]. Дослідники [60] припустили, що глікозилювання і протеоліз можуть вносити вклад в різноманітність ксиланаз.

В останні декілька років значний прогрес був досягнутий в клонуванні ряду ксиланолітичних генів у таких грибів як *Aspergillus swamori* [29], *A. nidulans* [31, 43], *A. oryzae* [32], *A. niger* [33], *Chaetomium gracile* [60], *Penicillium chrysogenum* [27], *Trichoderma viride* [56]. Крім ксиланолітичних генів, з аспергілів та *T. geesi* було ізольовано багато генів, які кодують допоміжні ферменти, такі як ацетилксилан естераза [24], [37],  $\alpha$ -L-арабінофуранозідаза [21], арабіноксилан арабінофуранозідаза [22],  $\alpha$ -глюкуронідаза [58], феруоїл естераза [57]. Це дозволило дослідити молекулярні механізми, які відповідають за регуляцію ксиланолітичних генів грибів [54].

### **Субстратна специфічність ксиланаз**

Знання механізму дії ферментів, які деградують ксилан, були отримані з дослідів по вивченню субстратної специфічності, впливу на активність латеральних замісників, специфічності зв'язків, які розщеплюються, і кінцевим продуктам. Ксиланози грибного походження добре охарактеризовані. Головним чином, існує два їх типи — не діючі на розгалужені компоненти, які не звільнюють арабінозу, і такі, що діють на розгалужені компоненти і звільнюють арабінозу з бокових ланцюгів, окрім розщеплення зв'язків в головному ланцюзі [46]. Багато ксиланаз грибного походження, таких як *Neurospora crassa* [40] і *Aspergillus niger* [51] здатні звільняти арабінозу з арабіноксилану. Ендоксиланаза *Streptomyces roseiscleroticus*, як було показано, відноситься до дерозгалужуючих ферментів [47]. Однак, ксиланози *Trichoderma harzianum* [59] і *A. niger* не здатні звільнювати арабінозу з арабіноксилану. Присутність як дерозгалужуючих, так і недерозгалужуючих ксиланаз, знайдена у *T. koningii* і *Ceratocystis paradoxa*. Ксиланаза, ізольована з *A. awamori*, відщеплює арабінозні замісники в арабіноксиланах злаків, але не розщеплює зв'язки в основному ланцюзі ксилану [34].

Відомо, що наявність замісників у високорозгалужених полісахаридах впливає на ксиланазну активність. Однак, повідомлялось [14] про більшу афінність ферментів *A. niger* і *T. viride* до зв'язків головного ланцюга, біля точки розгалуження. Ксиланози також варіюють за своєю активністю в залежності від целюлозних субстратів. Деякі з них діють тільки на ксилан, в той час як неспецифічні ксиланози *Myrothecium verrucaria*, *Penicillium capsulatum* і *P. funiculosum* діють щодо карбоксиметилцелюлози і ксилану. Ослаблена специфічність деяких ксиланаз, як і обмежена (вузька) інших може бути обумовлена різницею між залишками, які залучаються до каталітичних груп. Взагалі, відомо, що ксиланози специфічні щодо зв'язків між моносахаридами [14]. Ендоглюканаза *C. thermocellum* гідролізує  $\beta$ -1,3 зв'язки ячменю,  $\beta$ -глюкану, а також  $\beta$ -1,4 зв'язки в інших субстратах. Вважають [11], що трансглікозилювання ендонуклеазами приводить до утворення продуктів, які містять ті ж самі зв'язки, що і субстрат, оскільки вони містять стереоспецифічні місця зв'язування на будь-якій стороні каталітичного сайту. Як повідомлялось [9], ксиланаза *Cryptococcus albidus* утворює 1,3- $\beta$ -D-зв'язки завдяки реакції трансглікозилювання.





### Практичне застосування

Ксиланази викликають підвищену увагу дослідників завдяки тому, що вони можуть бути використані замість хлорних хімікатів у відбілюванні паперу [56], особливо у зв'язку із забрудненням оточуючого середовища. Лімітований гідроліз геміцелюлоз паперу ксиланазами підвищує здатність лігніну до екстракції з паперу в послідовних процесах відбілювання, зменшуючи кількість хлорину ( $\text{Cl}_2$ ) і гіпохлорину ( $\text{ClO}_2$ ) для біовідбілювання, а також вивільнення хлорорганічних речовин. Природно існуючі мікробні штами, здатні для продукції ксиланаз, вільних від активності целюлаз, будуть дуже привабливими для такого застосування. Найбільш важливими ферментами, які необхідні для підвищення відбілювання паперу є ендо- $\beta$ -ксиланази. Вони підвищують розщеплення осадженого ксилану, який утворився на поверхні целюлозних волокон після обробки. Це викликає підвищення проникності волокон деревини до відбілюючих хімікатів і дозволяє проходження великих фрагментів лігніну з деревини [4, 52]. Ксиланази мікроорганізмів, крім целюлозно-парперової промисловості, знаходять застосування в харчовій. Вони підвищують якість тіста і допомагають підняттю хліба. Крім того, ксиланази мікроорганізмів можуть бути корисними в біоконверсії лігноцелюлозного матеріалу в паливо і хімікати. Нещодавно виник значний промисловий інтерес до ксилану і його гідролітичному ферментативному комплексу, як додатка у виробництві харчування для тварин, людей, у виробництві напоїв, текстилю, у целюлозно-паперовій промисловості, виробництві етанолу і ксилітолу.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Родионова Н. А., Безбородов А. М. //Прикл. биохимия и микробиология.-1997. — 33,5.— с. 469-489.
2. Н. А. Родионова, Н. В. Дубовая, Е. В. Энейская, Л. И. Мартинович, И. М. Грачева, А. М. Безбородов. Очистка и характеристика эндо-(1-4)- $\beta$ -ксиланазы из *Geotrichum candidum* ЗС //Прикл. биохимия и микробиология.—2000.—36, 5. С. 535-540.
3. В. И. Элисашвили. Биосинтез и свойства целлюлаз и ксиланаз высших базидиомицетов //Прикладная биохимия и микробиология.—1993. — 29, 3.— С. 340-353.
4. Antonopoulos V. T., Hernandez M., Arias M. E., Mavrakos E., Ball A. S. The use of extracellular enzymes from *Streptomyces albus* for bleaching of eucalyptus Kraft pulp //Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2001. — 57. P. 92-97.
5. Archana A., Satyanarayana T. Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid state fermentation //Enzyme Microbiol. Technol. —1997.—21.— P. 12-17.
6. Atkins E. D. T. Three dimensional structure, interactions and properties of xylans. In: Xylan and xylanases (Visser J., Beldman G., Someren M. A. K., Voragen A. G. J., Eds) 1992. Elsevier, Amsterdam, P. 21-39.
7. Ball A. S., McCarthy A. J. Production and properties of xylanases from actinomycetes //J. Appl. Bacteriol. —1989. — 66.— P. 439-444.
8. Berebger J., Frixon C., Creuzet N., Bigliardi J. Production, purification and properties of thermostable xylanase from *Clostridium stercorarium* //Can. J. Microbiol. — 1985. — 31. — P. 635 — 643.
9. Biely P., Vranska M. Synthesis and hydrolysis of 1,3- $\beta$ -xylosidic linkages by endo-1,4- $\beta$ -xylanase of *Cryptococcus albidus* //Eur. J. Biochem. — 1983.— 129. — P. 645-651.
10. Carpita N. C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses //Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biology. — 1996 — 47. P. 445-476.
11. Coughlan M. P. Towards an understanding of the mechanism of action of main chain hydrolyzing xylanases //In: Xylans and Xylanases (Visser J., Beldman G., Someren M. A. K., Voragen A. G. J., Eds.) 1992, Elsevier, Amsterdam. — P. 111-141.
12. Das N. N., Das S. C., Sarkar A. K., Mukherjee A. K. Lignin-xylan ester linkage in mesta fiber (*Hibiscus cannabinus*) //Carbohydr. Res. — 1984. — 129. — P. 197-207.



13. Dekker R. F. H., Richards G. N. Purification, properties and mode of action of hemicellulase-produced by *Ceratocystis paradoxa* //Carbohydr. Res. 1975. — 39.— P. 97-114.
14. Dekker R. F. H., Richards G. N. Hemicellulases: Their occurrence, purification, properties and mode of action //Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1976. — 32. P. 277-352.
15. Deshpande V., Lachke A., Mishra C., Keskar S., Rao M. Mode of action and properties of xylanase and  $\beta$ -xylosidase from *Neurospora crassa* //Biotechnol. Bioeng. —1986. —26. — P. 1832-1837.
16. Dey D., Hinge J., Shendye A., Rao M. Purification and properties of extracellular endoxylanases from an alcalophilic thermophilic *Bacillus sp.*//Can. J. Microbiol. 1992. — 38. — P. 436-442.
17. Elegir G., Szakas G., Jeffries T. W. Purification, characterization and substrate specificities of multiple xylanases from *Streptomyces sp.* strain B-12-2 //Appl. Environ. microbiology. 1994. — 60, N7. — P. 2609-2615.
18. Ferreira-Filho E. X. The xylan degrading enzyme system. Brazilian J. Med. Biol. Res. — 1994. — 27. P. 1093-1109.
19. Funaguma T., Naito S., Morita M., Okumara M., Sigiura M/ hara A. Purification and some properties of xylanase from *Penicillium herquei* Banier and sartory // Agricult. Biol. Chem. — 1991. — 55. — P. 1163-1165.
20. Gessesse A. Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an alcaliphilic *Bacillus sp.* //Appl. Environ. Microbiol. — 1998.— 64, N9.— P. 3533-3535.
21. Gielkens M. M. C., Gonzales-Candelas L., Sanchez-Torres P., van de Vondervoort P., de Graaff L. H., Visser J., Ramon D. The *abiB* gene encoding the major  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase of *Aspergillus nidulans*: Nucleotide sequence, regulation and construction of a disrupted strain //Microbiology. — 1999. — 145. — P. 735-741.
22. Gielkens M. M. C., Dekkers E., Visser J., de Graaff L. H. Arabinoxylan degradation by fungi: Characterization of the arabinoxylan-arabinofuranohydrolase encoding genes from *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* //Curr. Geneet. 1999. — 31. — P. 22-29.
23. Gilbert M., Breuil C., Saddler J. N. Characterization of the enzymes present in the cellulase system of *Thielavia terrestris* 255B //Biores. Technol.1992. — 39. — P. 147-154.
24. de Graaff L. H., Visser J., van den Broeck H. C., Strozyk F., Kormelink F. J. M., Boonman J. C. Cloning, expression and use of acetylxyylan esterases from fungal origin // Eur. Patent Application no. 0507369-A/7. — 1992.
25. Grajek W. Production of D-xylanases by thermophilic fungi using different methods of culture //Biotechnol. Lett. — 1987. — 9. — P. 353-356.
26. Haapala R., Linko S., Parkkinen E., Suominen P. Production of endo-1,4- $\beta$ -glucanase and xylanase by *Trichoderma reesei* immobilized on polyurethane foam. Biotechnol. Tech. — 1994. — 8. — P. 401-406.
27. Haas H., Friedline E., Stoffler G., Redi B. Cloning and structural organization of a xylanase-encoding gene from *Penicillium chrysogenum* //Gene.- 1993. — 126. — P. 237-242.
28. Haltrich D., Nidetzky B., Kulbe K. D., Steiner W., Zupancic S. Production of fungal xylanases //Biores. Technol. 1996. — 58. — P. 137-161
29. Hessing J. G. M., van Rotterdam C., Verbakel J. M. A., Roza M., Maat J., van Gorcum R. F. M., van den Hondel C. A. J. J. Isolation and characterization of a 1,4- $\beta$ -endoxyylanase gene of *Aspergillus awamori* //Curr. Genet. — 1994.— 26.— P. 228-232.
30. Ito K., Ogassawara J., Sugimoto T., Ishikawa T. Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawachi* //Biosci. Biotechnol. Biochem. 1992. — 56. — P. 547-550.
31. Jose A., Gonsale P., Graaff L. H., de Visser J., Ramon D. Molecular cloning and expression in *Sacharomycea cerevisiae* of two *Aspergillus nidulans* xylanases genes//Appl. Environ. Microbiol. — 1996. — 62. — P. 2179-2182.
32. Kimura T., Kitamoto N., Kito Y., Karita S., Sakka K., Ohmiya K. Molecular cloning of xylanase gene *xyn G1* from *Aspergillus oryzae* KBN616, a shoyu koji mold, and analysis of its expression//J. Ferment. Bioeng. — 1998.— 85.— P. 10-16.
33. Kinoshita K., Takano M., Koseki T., Ito K., Iwano K. Cloning of the *xynNB* gene encoding xylanase B from *Aspergillus niger* and its expression in *Aspergillus kawachi*//J. Ferment. Bioeng. — 1995. — 79. — P. 422-428.
34. Kormelink F. J. M., Searle-van Leeuwen M. J. F., Wood T. M., Voragen A. G. J. 1-4- $\beta$ -D-Arabinoxyylan arabinofuranohydrolase: a novel enzyme in the bioconversion of arabinoxylan// Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1991. — 35. — P. 231-232.



35. Kulkarni N., Chauthaiwale J., Rao M. Characterization of the recombinant xylanases in *Escherichia coli* from an alkaliphilic thermophilic *Bacillus* sp. NCIM 59//Enzyme Microbiol. Technol. — 1995. — 17. — P. 972-976.
36. Kulkarni N., Shendye A., Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases //FEMS Microbiology Reviews. — 1999. — 23, N4. — P. 411-456].
37. Margolles-Clark E., Tenkanen M., Soederlund H., Penttila M. Acetylxyylan esterase from *Trichoderma reesei* contains an active site serine residue and a cellulose-binding domain//Eur. J. Biochem. — 1996. — 237. — P. 553-560.
38. Marui M., Nakanishi K., Tsueneo Y. Immunological properties and constituent amino acids of three xylanases produced inductively from *Streptomyces* sp.// Agric. Biol. Chem. — 1985. — 23. — P. 60-66.
39. Merivuori H., Sands J. A., Montenecourt B. S. Effects of tunicamycin on secretion and enzymatic activities of cellulase from *Trichoderma reesei*//Appl. Microbiol. Biotechnol. 1985. —23. P. 60-66.
40. Mishra C., Keskar S., Rao M. Production and properties of extracellular endoxylanases from *Neurospora crassa*//Appl. Environ. Microbiol. 1984. — 48. — P. 224-228.
41. Morales P., Madarro A., Perez-Gonzales J. A., Sendra J. M., Pinaga F., Flors A. Purification and characterization of alkaline xylanases from *Bacillus polymyxa*//Appl. Environ. Microbiology. — 1993. — 59, N5. — P. 1376-1382.
42. Nakamura S., Ishiguro Y., Wakabayashi K., Nakai R., Aono R., Horikoshi K. Purification and characterization of a thermophilic alkaline xylanase from thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. strain TAR-1//J. Mol. Catal. B Biocatal. — 1995. —1, N1.- P. 7-15.
43. Perez-Gonzalez J. A., van Peij N. N. M. E., Maccabe A. P. B. A., Ramon D., de Graaff L. H. Molecular cloning and transcriptional regulation of the *Aspergillus nidulans* xinD gene encoding a  $\beta$ -xylosidase// Appl. Environ. Microbiol. — 1998.— 64. — P. 1412-1419.
44. Petegem F. V., Collins T., Meuwis m-A., Gerday C., Feller G., Beeumen J. V. The structure of a cold-adapted family 8 xylanase at 1.3 Å resolution//J. Biol. Chem., 2003. — 278, N9. P. 7531-7539.
45. Prabhu k. A., Maheshwari R. Biochemical properties of xylanases from a thermophilic fungus, *Melanocarpus albomyces*, and their action on plant cell walls
46. Reily P. J. Xylanases: Structure and Function//Basic Life Sci. — 1981. 18. — P. 111-129.
47. Rifaat H. M., Nagieb Z. A., Ahmed Y. M. Production of xylanases by *Streptomyces* species and their bleaching effect on rice straw pulp//Appl. Ecology and Environmental Research. — 2005. — 4, N1. — P. 151-160.
48. Scarlbert A., Monties B., Lallemand J. Y., Guittet E., Rolando S. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw//Phytochemistry. —1985. — 24. — P. 1359-1362.
49. Stutzenberger F. J., Bodine A. B. Xylanase production by *Thermomonospora curvata*//J. Appl. Bacteriol. 1992. — 72. — P. 504-511.
50. Sunna A., Antranikian G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria//Crit. Rev. Biotechnol. — 1997. — 17. P. 39-67.
51. Takenishi S., Tsujisaka Y. Structure of the oligosaccharides from the enzymic hydrolyzate of rice straw arabinoxylan by a xylanase of *Aspergillus niger*//Agric. Biol. Chem. — 1973. — 37. — P. 1385-1391.
52. Techapun C., Poosaran N., Watanabe M., Sasaki K. Thermostable and alkali-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review// Process Biochemistry. — 2003. — 38. P. 1327-1340.
53. Timell T. E. Wood hemicelluloses//Carbohydr. Chem. — 1965. — 20. — P. 409-483.
54. Tsukagoshi N., Kobayashi T., Kato. Regulation of the amylolytic and (hemi)-cellulolytic genes in aspergilli J. Gen. Appl. Microbiol. 2001. — 47, N1. P. 1-19.
55. Ujiie M., Roy C., Yaguchi M. Low-molecular weight xylanase from *Trichoderma viride*//Appl. Environ. Microbiol. — 1991. — 57. — P. 1860-1862.
56. Viikari L., Kantelinen A., Sundquist J., Linko M. Xylanases in bleaching: from idea to industry//FEMS Microbiol. Rev. 1994. — 13. P. 335-350.
57. Vries R. P., Michelsen B., Poulsen C. H., Kroon P. A., van den Heuvel J. P. T. W., Faulds C. B. H., Williamson G., van den Hombergh J. P., Visser J. The fae genes from *Asper-*



*gillus niger* and *Aspergillus tubingensis* encode ferulic acid esterases involved in degradation of complex cell wall polysaccharides//Appl. Environ. Microbiol. — 1997. — 63. — P. 4638-4644.

58. Vries R. P., Poulsen C. H., Madrid S., Visser J. *aguA*, the gene encoding an extracellular  $\alpha$ -glucuronidase from *Aspergillus tubingensis* is specially induced on xylose and not on glucuronic acid//J. Bacteriol. — 1998. — 180. — P. 243-249.

59. Wong K. K. Y., Tan L. U. L., Saddler J. N., Yaguchi M. Purification of the third distinct xylanase from the xylanolytic system of *Trichoderma harzianum*//Can. J. Microbiol. — 1986. — 32. P. 570-574.

60. Wong K. K. Y., Tan L. U. L., Saddler J. N. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanases in microorganism: functions and applications//Microbiol Rev. 1988. — 52. P. 305-317.

61. Yoshino S., Oishi M., Moriyama R., Kato M., Tsukagoshi N. Two family G xylanase gene from *Chaetomium gracile* and their expression in *Aspergillus nidulans*//Curr. genet. — 1995. — 29. — P. 73-80.

62. Yoshioka H., Nagato N., Chavanich S., Nilubot N., Hayashida H. Purification and properties of thermostable xylanases from *Talaromyces byssochlamydooides* YH-50//Agric. Biol. Chem. 1981. — 45. P. 2425-2432.

63. Zamost B. L., Neilsen H. K., Starnes R. L. Thermostable enzymes for industrial application//J. Ind. microbiol. — 1991. — 8. — P. 71-82.

### Л. Д. Варбанец, Н. В. Борзова

Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України,  
ул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП Д03680, Україна, тел.: 8 (044)  
526 23 39, e-mail: varbanets@serv. imv. kiev. ua

## КСИЛАНАЗЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

### Реферат

В обзоре приведены данные о ксиланазах — ферментах, которые принимают участие в расщеплении природных полисахаридов, в частности, ксиланов. Показано, что в зависимости от происхождения, структура и химический состав ксиланов в значительной степени варьирует, что обуславливает участие в их расщеплении, кроме ксиланаз, и других ферментов, таких как арабинофуранозидазы,  $\beta$ -глюкуронидазы, эстеразы. Показано, что способность продуцировать ферменты, которые деградируют ксилан, свойственна грибам, актиномицетам и зубактериям. Ксиланазы разного происхождения отличаются физико-химическими свойствами, субстратной специфичностью. Показана возможность использования ксиланаз в целлюлозо-бумажной, пищевой промышленности, в производстве хлеба, напитков, текстиля.

**Ключевые слова:** ксиланазы, микроорганизмы, субстратная специфичность, физико-химические свойства, практическое использование.



L. D. Varbanets, N. V. Borzova

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, Academ. Zabolotny str.,  
154, Kyiv, Ukraine, tel.: 8 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

## XYLANASES OF MICROORGANISMS

### Summary

Xylanases, enzymes which participate in destruction of natural polysaccharides and xylans were discussed. It was established that the origin, structure and chemical composition of xylans are varied. This fact makes for participation in splitting except xylanases also such enzymes as arabinofuranosidases,  $\beta$ -glucuronidase, esterase. It was shown that the ability to produce enzymes degrading xylan is characteristic for fungi, actinomycetes, eubacteria. The xylanases of different origin are varied by physico-chemical properties, substrate specificity. Possibility to use xylanases in pulp and paper industry, food industry, baking of bread, producing of beverages and textile has been proved.

**Key words:** xylanases, microorganisms, substrate specificity, physico-chemical properties, practical use.

