

ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕЗУ ПОЗАКЛІТИННИХ ЦЕЛЮЛАЗ І КСИЛАНАЗИ У *FENNELIA FLAVIPES* B.J. WILEY ET E.G. SIMMONS

Комплекси целюлозо- і ксиланолітичних ферментів широко застосовуються в технологіях переробки лігноцелюлозної біомаси. Найбільш перспективними вважають розробки технологій отримання біоетанолу другої генерації, загальний обсяг виробництва якого може досягти 125 млрд. л у 2017 р. [2, 10]. Ефективність ферментативного гідролізу лігноцелюлозної біомаси залишається ключовим фактором в технологіях її переробки, причому лімітуючим чинником виступає неоднорідність її структури. Для ефективної трансформації лігноцелюлозних відходів першочергове значення має кількість та якість целюлозо- та ксиланолітичних ферментів, яка варіює в кожному конкретному випадку [8, 11].

У сучасних технологіях найбільше поширення отримали комерційні суміші ферментів, які виробляються компаніями Novozymes та Genencor з генетично покращених штамів гриба *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) [12]. Для ефективного синтезу цих ферментів необхідне застосування індукторів. Відомо, що целобіоза, софороза і лактоза індукують синтез целюлозолітичних ферментів, тоді як ксилоза та арабіноза – ксиланолітичних ферментів. Дія подібних індукторів на експресію специфічного гену є тимчасовою і регулюється їх швидкістю метаболізму джерела вуглецю [6, 13].

Використання як індукторів змішаних джерел вуглецю, наприклад лігноцелюлозної біомаси, має широкі потенційні можливості, однак особливості синтезу ферментативних комплексів в цих умовах детально не досліджені.

Класична схема гідролізу целюлози включає синергічну дію трьох класів ферментів: ендо-1,4-в-глюканаза (хаотично розщеплює внутрішні зв'язки в ланцюзі целюлози); екзо-1,4-в-глюканаза (атакує кінці полімеру целюлози, утворюючи целобіозу); в-глюкозидаза (конвертує целобіозу в глюкозу) [4, 5]. Відомо, що експресія генів целюлаз і секреція цих ферментів контролюється на рівні транскрипції, що найбільш детально вивчені у

мікроскопічних грибів *Aspergillus niger* і *Hypocrea jecorina*. Визначені регулони, які складаються з більш ніж 200 генів і включають основні структурні та ферментативні компоненти для ефективного гідролізу целюлози. Регулони містять не лише виражені гени целюлаз, але й багато генів геміцелюлаз. Цей факт вказує на те, що для ефективного гідролізу складних природних субстратів необхідні комплементарні ферментативні активності [9].

Оскільки синтез целюлозо- і ксиланолітичних комплексів контролюється у мікроміцетів різними неконсервативними механізмами, тому пошук ефективних індукторів синтезу целюлаз є важливим етапом біотехнологічних досліджень.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був штам *Fennellia flavipes*, який зберігається в колекції відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології НАНУ. Попередніми дослідженнями встановлено його здатність до синтезу комплексу целюлозолітичних ферментів.

Посівний матеріал вирощували на картопляно-глюкозному агарі впродовж 10–14 діб при температурі 24–26 °С. Культивування грибів проводили в глибинних умовах (210–230 об/хв) при температурі 22–24 °С в колбах Ерленмейера з використанням поживного середовища Чапека з додаванням різних джерел вуглецю. Для визначення індукторів синтезу целюлозолітичного комплексу у дослідженого штаму були використані такі речовини, 5 г/л: лактоза, арабіноза, сорбітол – з додаванням фільтрувального паперу (ФП) та Na-КМЦ (Sigma), пшенична солома – без додавання ФП.

У зразках визначали ендо-, екзоглюканазну та ксиланазну активність.

Ендоглюканазну активність визначали за зниженням в'язкості 0,5 % розчину Na-КМЦ при температурі 50 °С після 10 хв інкубування з 1 мл культурального фільтрату [12]. Екзоглюканазну активність визначали за гідролізом фільтрувального паперу (ФП-активність).

Редукуючі речовини визначали за методом з ДНС реактивом після інкубації 1 мл культурального фільтрату та 1 мл 0,05 М цитратного буферу (рН 4,5) з ФП (1-6 см) при температурі 50 °С протягом 1 год [3, 7].

Ксиланазну активність визначали за гідролізом букового ксилану (Sigma). Редукуючі речовини визначали за методом з ДНС реактивом після інкубації 0,18 мл 1 %-го розчину букового ксилану в 0,05 М цитратному буфері (рН 4,5) з 20 мкл культурального фільтрату при температурі 50°С протягом 5 хв [3, 7]. За одиницю екзоглюканазної та ксиланазної активності приймали таку кількість ферменту, яка в заданих умовах утворювала 1 мкмоль глюкози чи ксилози відповідно за 1 хв на 1 мл культурального фільтрату.

Результати та обговорення

Відомі два основні типи індукторів синтезу целюлозолітичних ферментів у *T. reesei* – основного світового продуценту целюлаз – специфічні субстрати (пшенична солома, ФП, Na-КМЦ) та неспецифічні (лактоза, сорбітол, арабіноза) [9]. У штаму *F. flavipes* целюлази визначались в середовищі лише при наявності специфічних субстратів. Введення неспецифічних індукторів в середовище культивування, на відміну від *T. reesei*, не викликало синтезу целюлозолітичних ферментів, а при додаванні їх в поживне середовище з ФП синтез целюлаз практично повністю блокувався. Дослідження динаміки ендоглюканазної активності за наявності специфічних індукторів в поживному середовищі показало, що вона

характеризувалась тривалою (2–3 доби) фазою адаптації до субстрату, а максимальна ферментативна активність спостерігалась на 5-добу культивування на середовищі з пшеничною соломою (14–17 од/мл) (рис. 1). На середовищах з Na-КМЦ та ФП ендоглюканазна активність штаму була в 4,5–9,5 разів нижчою за таку на середовищі з пшеничною соломою. На середовищі з ФП ендоглюканазна активність штаму *F. flavipes* була в 6,7 рази нижчою, ніж у *Fusarium sp. 5* [1].

Досить високі значення ФП-активності (0,3–0,4 од/мл) відмічені лише для *F. flavipes* на поживному середовищі з пшеничною соломою, що в 9 разів вище, ніж у *Fusarium sp. 5* [1]. В інших випадках екзоглюканазна активність не перевищувала 0,05 од/мл. Подібно до ендоглюканазної активності, при визначенні ФП-активності також виявлена тривала фаза адаптації. Проте максимальну активність спостерігали раніше, ніж у випадку ендоглюканазної активності, – як правило на 4–5 добу культивування (для пшеничної соломи – на 6 добу) (рис. 2).

На поживному середовищі з пшеничною соломою ксиланазна активність, так само як і екзоглюканазна, реєструвалась з 3-ої доби росту і досягала максимуму на 7–8 добу культивування. Вона була в 1,4 рази вищою у *F. flavipes*, ніж у *Fusarium sp. 5* [1]. Ксиланазна активність, як і дві згадані вище целюлолітичні, була найвищою на поживному середовищі з пшеничною соломою і практично не виявлялась (до 5 од/мл) на інших субстратах, в тому числі на ФП та Na-КМЦ (рис. 3).

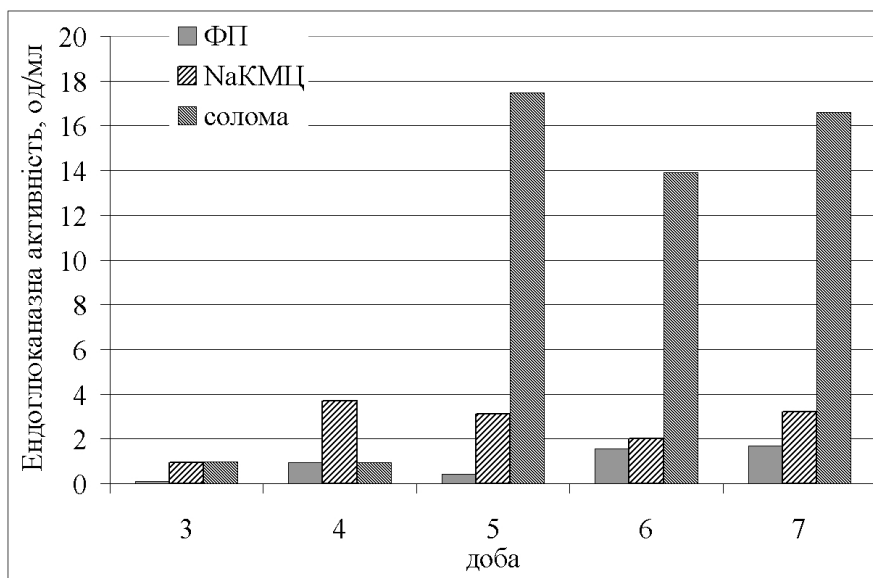


Рис. 1. Ендоглюканазна активність штаму *Fennellia flavipes* на середовищах з різними субстратами

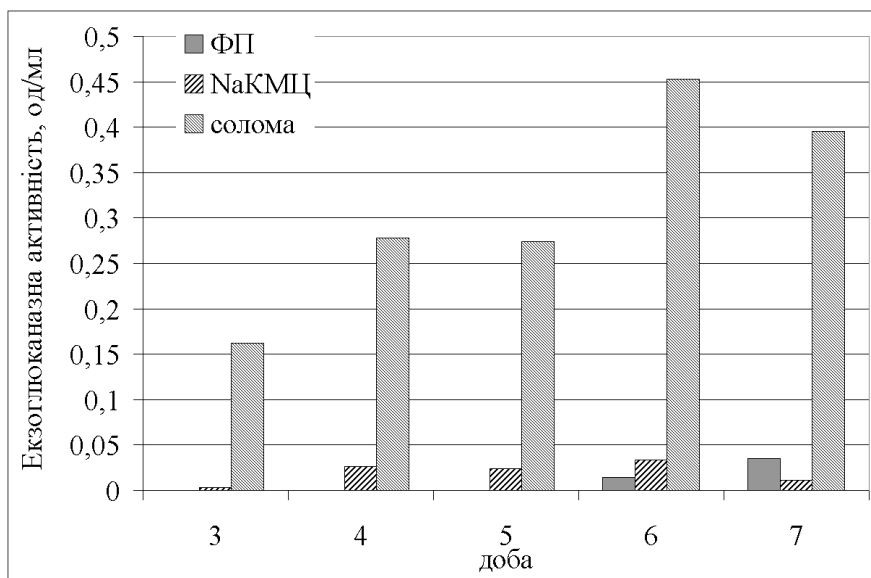


Рис. 2. Екзоглюканазна активність штаму *Fennellia flavipes* на середовищах з різними субстратами

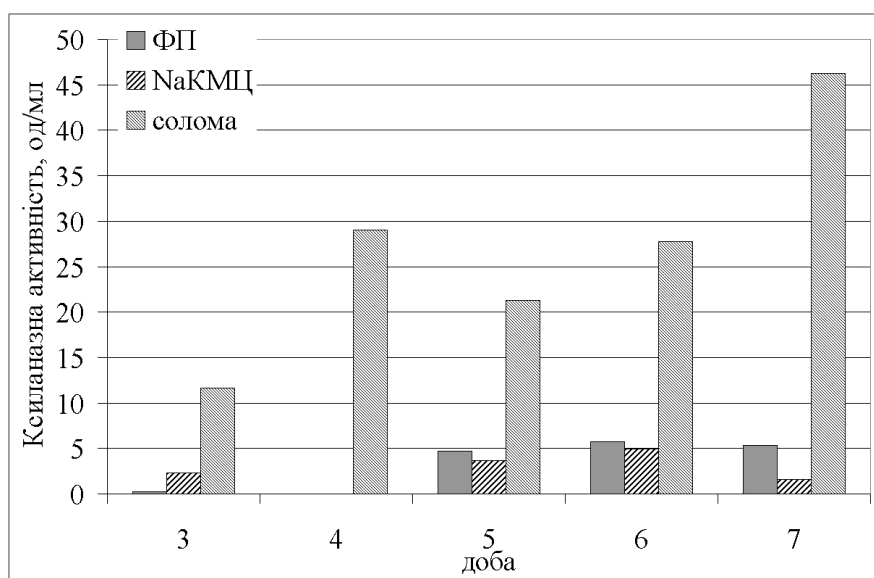


Рис. 3. Ксиланазна активність штаму *Fennellia flavipes* на середовищах з різними субстратами

Такий результат можна пояснити наявністю специфічних механізмів індукції комплексів целюлаз і ксиланаз, які, як було показано для деяких видів роду *Fusarium* та *Neurospora crassa*, пов'язані з різною роллю консервативних факторів транскрипції цих генів [9].

Висновки

Отже, використання комплексного джерела вуглецю (пшеничної соломи) призводить до ефективної індукції синтезу позаклітинних целюлозо- і ксиланолітичних ферментативних комплексів у штаму *Fennellia flavipes* і *Fusarium* sp. 5 (показано попередніми

дослідженнями). Такі розчинні неспецифічні індуктори як лактоза, арабіноза і сорбітол, що індуквали синтез целюлаз у *Trichoderma reesei* [9], не активували процес синтезу комплексу целюлаз та ксиланаз у дослідженого штаму. Встановлений нами спектр позаклітинної целюлозолітичної та ксиланазної активності у *F. flavipes* свідчить про перспективність подальших досліджень з метою отримання ферментних препаратів та їх використання в технологіях переробки сільськогосподарських відходів для отримання целюлозного біоетанолу.

Література

1. Павличенко А.К., Пасик Ю.С., Курченко И.Н. и др. Некоторые особенности индукции синтеза компонентов целлюлазного комплекса *Fusarium* sp. // IX Міждзнародowej naukow-praktycznej konferencji "Nauka i inowacja", 7–15 жовт. 2013 р.: матеріали конф., Vol. 15 – Przemysl: "Nauka i studia", 2013. – С. 22–26.
2. Biofuels and food security. A report by High Level Panel of Experts on Food Security and Nutrition of the Committee on World Food Security // Gitz V. ed. – Rome, 2013. – 131 p.
3. Ghose T.K. Measurement of Cellulase Activities // Pure and Applied Chemistry. – 1987. – 59, N 2. – P. 257–268.
4. Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Eijsink V.G.H. Novel enzymes for the degradation of cellulose // Biotechnology for Biofuels. – 2012. – 45, N 5. – 13 p.
5. Kumar D., Murthy G.S. Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production // Biotechnology for Biofuels. – 2013. – 6, N 63. – 20 p.
6. Ike M, Park J.Y., Tabuse M., Tokuyasu K. Controlled preparation of cellulases with xylanolytic enzymes from *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) by continuous-feed cultivation using soluble sugars // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2013. – 77, N 1. – P. 161–166.
7. Miller G.I. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars // Analytical Chemistry. – 1959. – 31, N 3. – P. 426–428.
8. Olsson L., Juergensen H., Krogh K.B.R., Roca C. Bioethanol production from lignocellulosic material // Polysaccharides: structural diversity and functional versatility. – New York: Marcel Dekker Inc., 2004. – P. 957–993.
9. Peterson R., Nevalainen H. *Trichoderma reesei* RUT-C30 – thirty years of strain improvement // Microbiology. – 2012. – 158, N 1. – P. 58–68.
10. Schnepf R., Yacobucci B.D. Renewable Fuel Standard (RFS): Overview and Issues // USA: Congressional Research Service Report, 2013. – 31 p.
11. Sun Y., Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production // Bioresource Technol. – 2002. – 83. – P. 1–11.
12. Zhang Y.H.P., Hong J., Ye X. Cellulase Assays // Biofuels: Methods and Protocols, Methods / Molecular Biology by ed. Mielenz. – 2009. – 581. – P. 213–231.
13. Znameroski E.A., Coradetti S.T., Rochec C.M. et al. Glass Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by cellodextrins // PNAS. – 2012. – 109, N 16. – P. 6012–6017.

SYRCHIN S.O., KHARKEVICH O.S., PAVLYCHENKO A.K., YURIEVA O.M., NAKONECHNA L.T., PASIK YU.S., KURCHENKO I.M.

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, Kiev, MSP, D03680, Zabolotny str., 154, e-mail: syrchin@ukr.net

BIOSYNTHESIS PECULIARITIES OF EXTRACELLULAR CELLULASES AND XYLANASE BY *FENNELIA FLAVIPES* B.J. WILEY ET E.G. SIMMONS

Aims. The aim of this research was to study the effect of the inductors of the cellulases and xylanase biosynthesis process. **Methods.** Cellulase activity has been measured by filter paper activity (exoglucanase) and viscosity reduction of Na-CMC solution (endoglucanase). Xylanase activity has been determined by hydrolysis of beech xylan. **Results.** Lactose, filter paper, arabinose, Na-CMC, wheat straw, sorbitol have been studied as possible inductors of cellulase and xylanase complex of *Fennellia flavipes*. The only wheat straw has induced significant value of cellulase and xylanase activity. *Fennellia flavipes* have not synthesized cellulase and xylanase, when it was cultivated on non-specific substrates. **Conclusions.** Effective synthesis of extracellular cellulase and xylanase complex by *F. flavipes* have been indicated that further research is a promising for obtaining of enzyme preparations and using for agricultural waste processing technology and cellulosic ethanol producing.

Key words: *Fennellia flavipes*, cellulase, xylanase, inductor, biosynthesis.