

ЮР'ЄВА О.М.¹✉, ГРИГАНСЬКИЙ А.П.², СИРЧІН С.О.¹, НАКОНЕЧНА Л.Т.¹,
ПАВЛИЧЕНКО А.К.¹, КУРЧЕНКО І.М.¹

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України,
Україна, 03143, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 154, e-mail: elenayurieva@ukr.net

² L.F. Lambert Spawn Co.,
USA, Coatesville, Pennsylvania

✉ elenayurieva@ukr.net

β-ГЛЮКОЗИДАЗИ ЕНДОФІТНИХ І САПРОТРОФНИХ ШТАМІВ *PENICILLIUM FUNICULOSUM*

Целюлази широко використовуються в різних галузях промисловості і синтезуються, в основному, міцеліальними грибами родів *Penicillium*, *Aspergillus* і *Trichoderma* [1]. Останнім часом увагу дослідників зосереджено на розробці ефективних технологій отримання целюлозного біоетанолу. Основним продуцентом целюлозолітичних ферментних препаратів є аскоміцет *Trichoderma reesei*, що має високий рівень синтезу і секреції целюлаз у кількостях, що перевищують 100 г/л [1, 2]. За даними секретомного аналізу встановлено, що гриби роду *Trichoderma*, як правило, характеризуються високою продуктивністю, переважно щодо целюлаз, але значно меншою мірою стосовно інших карбогідраз, зокрема β-глюкозидаз. Низький рівень синтезу β-глюкозидази знижує ефективність трансформації лігноцелюлозної біомаси та можливість застосування препаратів на основі *T. reesei* [1]. Так, в оптимальних умовах індукції β-глюкозидази становлять лише 1 % від загальної кількості секретованих целюлаз *T. reesei*. Існує кілька підходів для запобігання цього недоліку *T. reesei*. Наприклад, додавання препаратів β-глюкозидази, що синтезуються іншими грибами, значно підвищує ефективність гідролізу целюлозних субстратів. З іншого боку, методами генетичної інженерії активність β-глюкозидази *T. reesei* було підвищено шляхом експресії гетерологічних генів β-глюкозидази з інших грибів, зокрема таких як *Penicillium decumbens*, *Aspergillus aculeatus* і *Periconia* sp. [2–4]. Незважаючи на багаторічні дослідження, на сьогодні не створено штам *T. reesei*, що синтезував би ефективний целюлозолітичний комплекс з оптимальним співвідношенням різних типів ферментів. Тому пошук нових природних штамів мікроміцетів з високим рівнем синтезу β-глюкозидази є наразі актуальним.

Представники грибів роду *Penicillium* мають збалансований набір целюлозолітичних ферментів, зокрема високий рівень β-глюкозидазної активності [5, 6]. Серед них перспективними продуцентами β-глюкозидаз є штами *Penicillium funiculosum*, що синтезують комплекс карбогідраз – ендоглюканази, целобіогідролази, β-глюканази, ксиланази і манози [7–9].

Матеріали і методи

У роботі використано 20 ендоефітних і сапротрофних штамів *P. funiculosum*, що підтримуються у колекції культур мікроскопічних грибів відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Інокулюм штамів вирощували в колбах Ерленмейера об'ємом 750 мл у рідкому картопляно-глюкозному середовищі за глибинних умов (210–230 об./хв., $t=26 \pm 2^\circ\text{C}$) протягом 48 год [10]. Мікроміцети культивували в зазначених вище умовах протягом 6 діб у рідкому середовищі Чапека з додаванням 0,5 % Na-КМЦ або 0,5 % пшеничної соломи як єдиного джерела вуглецю. Після завершення культивування міцелій гриба та залишки субстрату відділяли фільтруванням. Отриманий культуральний фільтрат (КФ) використовували для визначення β-глюкозидазної активності.

Визначення β-глюкозидазної активності. β-Глюкозидазну активність визначали спектрофотометрично при 425 нм за гідролізом рNPG на 4 і 6 доби росту [11]. Реакційна суміш складалася з 0,1 мл 10 мМ п-нітрофеніл-β-D-глюкопіранозиду (рNPG) (Sigma) в натрій ацетатному буфері (рН 5,0) та 0,1 мл КФ, час інкубації – 10 хв за температури 50°C. Реакцію зупиняли додаванням 0,2 мл 0,5 М Na₂CO₃. За одиницю β-глюкозидазної активності приймали та-

© ЮР'ЄВА О.М., ГРИГАНСЬКИЙ А.П., СИРЧІН С.О., НАКОНЕЧНА Л.Т., ПАВЛИЧЕНКО А.К.,
КУРЧЕНКО І.М.

ку кількість ферменту, яка за заданих умов утворювала 1 мкмоль п-нітрофенолу на 1 мл КФ за 1 хв.

Виділення геномної ДНК. ДНК з міцелію *P. funiculosum* виділяли модифікованим методом Dörnte [12, 13] з використанням мікрохвильового випромінювання. Культуру гриба вирощували в чашках Петрі на КГА протягом 6–10 діб, з поверхні відбирали 10–30 мкг повітряного міцелію і поміщали в пробірки для ПЛР об'ємом 200 мкл, що містили 100 мкл стерильної дистильованої води (MilliQ). Пробірки щільно закривали і піддавали дії мікрохвильового випромінювання потужністю 800 Вт протягом 1 хв, охолоджували 1 хв і повторювали нагрів ще раз протягом 1 хв. Після цього пробірки центрифугували за 2000 g (Labnet Centrafuge Mini C1301), відбирали супернатант і зберігали за -20°C до часу використання в ПЛР.

Для ампліфікації ITS ділянок рибосомальної ДНК *P. funiculosum* використовували праймери ITS1 (5'-TCCGTAAGGTGAACCTGCCG-3') та ITS4 (5'-TCCTCCGCTTAT TGATATGC-3') [14]. Нами використано набір Qiagen PCR Core Kit, 20 мкл реакційний об'єм з концентрацією кожного праймера і дНТФ 0,2 мМ. Цикл ампліфікації складався з 35 циклів відпалу за 55°C за 1,5 хвилини і 2 хвилини елонгації при 72°C . Для дефосфорилування дНТФ використовували лужну фосфатазу з креветки (SAP, GE Healthcare) і екзонуклеазу I (EXO, New England Biolabs). Для цієї процедури використовували 0,1 од SAP і 0,23 од EXO на зразок, дотримуючись рекомендацій виробника. Після очищення продукти ампліфікації сіквенували за методом Сангера на сіквенаторі Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer в PrimBio Research Institute (Exton, PA, USA). Послідовності редагували та аналізували за допомогою програмного забезпечення Geneious 8.1.8 (Biomatters LTD). Для статистичної обробки даних використовували пакет Microsoft Excel.

Результати та обговорення

Модифікований метод виділення геномної ДНК з грибів показав свою ефективність і дозволив отримати препарати для проведення ПЛР. При проведенні ПЛР з використанням набору праймерів ITS1 та ITS4 отримано фрагмент розміром 439 пн, послідовність якого було визначено як *Talaromyces funiculosus* (анаморфа *Penicillium funiculosum*) і зареєстровано в

GenBank за номером KY620212. Останнім часом для молекулярної ідентифікації грибів роду *Penicillium* досліджували різні варіанти праймерів і навіть пропонували додаткові генетичні маркери (ген β -тубуліну). Тому нами було використано пару праймерів ITS1–ITS4, за допомогою яких ампліфікується ITS1–5,8S–ITS2 фрагмент рДНК грибів і які мають певні переваги порівняно з ITS1–ITS2 за рахунок більшої видоспецифічності.

Дослідження β -глюкозидазної активності ендоефітних штамів *P. funiculosum* проводили на середовищі з Na-КМЦ. На 4-ту добу культивування вона становила $0,56 \pm 0,005 \div 3,62 \pm 0,003$ од/мл і $0,76 \pm 0,007 \div 4,32 \pm 0,005$ од/мл – на 6-ту (рис. 1, 2). Для ґрунтових штамів ця активність на 4-ту добу досягала $0,87 \pm 0,002 \div 2,12 \pm 0,006$ од/мл і на 6-ту добу – $1,87 \pm 0,008 \div 4,48 \pm 0,004$ од/мл відповідно. На 4-ту добу культивування β -глюкозидаза ендоефітів була в 1,0–1,7 разів вищою, ніж у ґрунтових. Ґрунтові штами виявилися активнішими в 1,1–2,5 разів на 6-ту добу порівняно з ендоефітними. На середовищі з Na-КМЦ β -глюкозидазна активність мікроміцетів *P. funiculosum* з різних еконіш зростала зі збільшенням терміну культивування, виняток становив ендоефітний штам 16786, активність якого на 4-ту добу культивування була в 2,5 разів вищою, ніж на 6-ту.

Показано, що всі штами *P. funiculosum*, ізолювані з різних еконіш, здатні гідролізувати природний субстрат пшеничну солому (рис. 2). Для ендоефітних штамів β -глюкозидаза становила $2,15 \pm 0,005 \div 13,65 \pm 0,007$ од/мл, для ґрунтових – $2,07 \pm 0,004 \div 8,93 \pm 0,003$ од/мл відповідно. Ендоефітні штами характеризувалися вищою β -глюкозидазною активністю, ніж ґрунтові. На 4-ту добу культивування ця активність була в 1,1–1,3 рази вищою, на 6-ту – до 1,5 раза. Як і у випадку на середовищі з Na-КМЦ, на середовищі з пшеничною соломою β -глюкозидазна активність ізолятів *P. funiculosum* зростала зі збільшенням терміну культивування.

Усі досліджені ізоляти *P. funiculosum* характеризувалися β -глюкозидазною активністю, причому на природному субстраті (пшенична солома) вона була вищою в 2,8–3,2 раза для ендоефітних і в 1,1–2,0 рази для ґрунтових штамів. Виходячи з викладеного вище, можна зробити висновок, що природний субстрат пшенична солома є індуктором синтезу β -глюкозидазної активності.

Конверсія лігноцелюлозної біомаси до глюкози потребує використання комплексу целюлозолітичних ферментів. Ефективний гідроліз є результатом синергічної дії мультикомпонентної ферментативної системи, що складається з трьох основних груп ензимів: ендоглюканаз, целобіогідролази і β-глюкозидази [15]. Ключовим ферментом комплексу є β-глюкозидаза (β-D-глюкозид глюкогідролаза, ЕС 3.2.1.21), що гідролізує целобіозу та коротколанцюгові целолігосахариди – продукти гідролізу двох інших ферментів, з утворенням кінцевого продукту глюкози. Серед ферментів, що гідролізують лігноцелюлозну біомасу, ефективність β-глюкозидази має важливе значення для комплексу загалом, оскільки вона знижує концентрацію целобіози – інгібітора целюлаз, особливо целобіогідролази.

Відомо, що термофільний ґрунтовий штам *Melanocarpus* sp. МТСС 3922 на середовищі з

рисовою соломою синтезує β-глюкозидазу (132,4 од/г субстрату) [16]. Встановлено здатність продукувати β-глюкозидазу штамми мікроміцетів *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Humicola insolens*, *Neosartorya fischeri* і *P. funiculosum* (од/мг білка): 20,83; 55,6; 18,1; 886 і 1920 відповідно [17].

Показано, що *P. funiculosum* має збалансовану кількість основних целюлолітичних ферментативних активностей, зокрема, високу β-глюкозидазу [8, 18–20]. При гідролізі цукрового очерету показано продукування целюлаз штамом *P. funiculosum*: FPase – 0,25; КМЦаза – 1,80 і β-глюкозидазна – 0,80 од/мл [8]. *P. funiculosum* є продуцентом целюлаз і β-глюкозидази, у ферментному препараті існує баланс між целюлазними активностями з β-глюкозидазною активністю 26,6 од/мл [18].

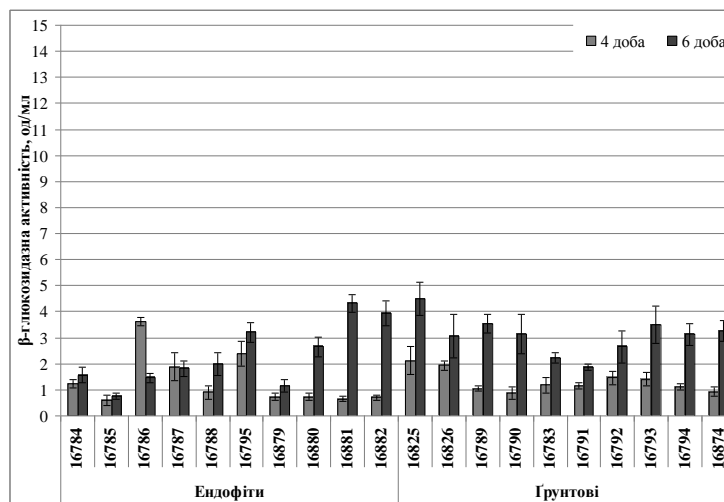


Рис. 1. β-глюкозидазна активність штамів *P. funiculosum* з різних еконіш на середовищі з Na-КМЦ.

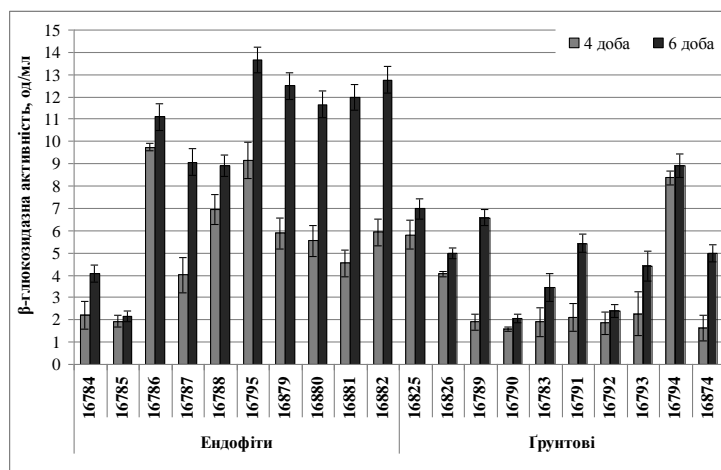


Рис. 2. β-глюкозидазна активність штамів *P. funiculosum* на середовищі з пшеничною соломою.

Види *Penicillium* здатні продукувати комплекс целюлаз із кращим співвідношенням FPase і β -глюкозидази порівняно з *T. reesei* [21]. Ферментний препарат з *P. funiculosum* характеризувався високим співвідношенням FPase і β -глюкозидази (1:4.5), в той час як у комерційному препараті Multifect® воно становило 1:1 [18]. Ефективність гідролізу попередньо обробленого жому цукрового очерету ферментативною сумішшю (екстракт з *P. funiculosum* та Multifect®) досягала 88 %, в той час як за аналогічних умов Multifect® – 68 % [22].

Із геному *P. funiculosum* NCL1 виділено ген Bgl4, що кодує синтез β -глюкозидази (складається з 857 амінокислот) [23]. У цих послідовностях ідентифіковано каталітичні домени, специфічні для глюкозидгідролаз родини 3. Рекомбінантний штам *Pichia pastoris* KM71H синтезував гетерологічний білок rBgl4, що показав високий коефіцієнт конверсії п-нітрофеніл- β -глюкозиду і целобіози – 3332 і 2083 мкмоль/хв/мг відповідно. Рекомбінантний білок rBgl4 успішно клонували у *T. reesei* Rut-C30, що удвічі підвищило вихід глюкози, тобто rBgl4 є

термо- і глюкозотолерантною β -глюкозидазою та ефективною добавкою до комерційних целюлаз, що забезпечує рентабельність виробництва 2G біоетанолу.

Висновки

Усі досліджені нами штами *P. funiculosum* характеризувалися β -глюкозидазною активністю. Аналіз геномів споріднених штамів свідчить про наявність у них кількох генів β -глюкозидаз GN3 родини, що характеризуються широкою субстратною специфічністю. Штами *P. funiculosum*, зокрема 16795, є перспективними для подальших досліджень як на рівні отримання додаткових до *T. reesei* ферментних препаратів β -глюкозидази, так і для створення рекомбінантних конструкцій із метою отримання збалансованих за складом целюлазних комплексів.

Представлену роботу виконано за фінансової підтримки цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України «Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії».

Література

1. Adav S.S., Chao L.T., Sze S.K. Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2012. – 11, № 7. doi: 10.1074/mcp.M111.012419.
2. Ma L., Zhang J., Zou G., Wang C., Zhou Z. Improvement of cellulase activity in *Trichoderma reesei* by heterologous expression of a beta-glucosidase gene from *Penicillium decumbens* // *Enzyme Microb. Technol.* – 2011. – 49, № 4. – P. 366–371. doi: 10.1016/j.enzmictec.2011.06.013.
3. Treebupachatsakul T., Shioya K., Nakazawa H., Kawaguchi T., Morikawa Y., Shida Y., Ogasawara W., Okada H. Utilization of recombinant *Trichoderma reesei* expressing *Aspergillus aculeatus* beta-glucosidase I (JN11) for a more economical production of ethanol from lignocellulosic biomass // *J. Biosci. Bioeng.* – 2015. – 120, № 6. – P. 657–665. doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.04.015.
4. Harnpicharnchai P., Champreda V., Sornlake W., Eurwilaichitr L. A thermotolerant beta-glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars // *Protein Expr. Purif.* – 2009. – 67, № 2. – P. 61–69. doi: 10.1016/j.pep.2008.05.022.
5. Gusakov A.V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production // *Trends Biotechnol.* – 2011. – 29, № 9. – P. 419–425. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.04.004.
6. Marjamaa K., Toth K., Bromann P.A., Szakacs G., Kruus K. Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocellulose // *Enzyme Microb. Technol.* – 2013. – 52, № 6–7. – P. 358–369. doi: 10.1016/j.enzmictec.2013.03.003.
7. Ramani G., Meera B., Vanitha C., Rao M., Gunasekaran P.. Production, purification, and characterization of a β -glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1 // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2012. – 167, № 5. – P. 959–972. doi: 10.1007/s12010-012-9645-4.
8. de Castro A.M., Leite S.G. Ferreira, Pereira N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis // *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – 37, № 2. – P. 151–158. doi: 10.1007/s10295-009-0656-2.
9. Окунев О.Н., Сеницын А.П., Черноглазов В.М., Соловьева И.В. Штамм мицелиального гриба *Penicillium funiculosum* – продуцент комплекса карбогидраз, содержащего целлюлазы, бета-глюканазы, ксиланазы, пектиназы и манназы. Патент Российской Федерации № 2287570 20.11.2006. Бюл. № 32.
10. Методы экспериментальной микологии: Справочник / под ред. В.И. Билай. – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.
11. Parry N.J., Beever D.E., Owen E. et al. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable beta-glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus* // *Biochemical Journal*. – 2001. – 353, № 1. – P. 117 – 127.
12. Dörnte B., Kües U. Fast microwave-based DNA extraction from vegetative mycelium and fruiting body tissues of Agaricomycetes for PCR amplification // *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* – 2013. – 7. – P. 825–836.

13. Izumitsu K., Hatoh K., Sumita T., Kitade Y., Morita A., Gafur A., Ohta A., Kawai M., Yamanaka T., Neda H., Ota Y., Tanaka Ch. Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR // *Mycoscience*. – 2012. – 5, № 53– P. 396–401. doi: 10.1007/s10267-012-0182-3.
14. Toju H., Tanabe A.S., Yamamoto S., Sato H. High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples // *PLoS ONE*. – 2012. – 7, № 7. e40863. doi: 10.1371/journal.pone.0040863.
15. Xhang X-Z., Zhang Y-H.P. Cellulases: characteristics, sources, production, and application. – In: *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of fuels, Chemicals, and Polymers* / Shang-Tian Yang (ed.). – Wiley-AICHE, 2013. – Chapter 8. – P. 131–146.
16. Kaur J., Chadha B.S., Kumar D.A., Kaur G.S., Saini H.S. Purification and characterization of β-glucosidase from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922 // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2007. – 2, № 10. doi: 10.2225/vol10-issue2-fulltext-4.
17. Sørensen A., Lübeck M., Peter S. Lübeck P.S., Ahring B.K. Fungal Beta-Glucosidases: A Bottleneck in Industrial Use of Lignocellulosic Materials // *Biomolecules*. – 2013. – № 3. – P. 612–631. doi: 10.3390/biom3030612.
18. Maeda R.N., Serpa V.I., Rocha V.A.L., Mesquita R.A.A., Santa Anna L.M.M., de Castro A.M., Driemeier C.E., Pereira Jr.N., Polikarpov I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases // *Process Biochemistry*. – 2011. – 5, № 46. – P. 1196–1201. doi: 10.1016/j.procbio.2011.01.022.
19. Юр'єва О.М., Курченко І.М., Сирчін С.О., Харкевич О.С., Павличенко А.К., Наконечна Л.Т. Комплекс целюлозолітичних і ксиланолітичних ферментів *Penicillium funiculosum* Thom // Фактори експериментальної еволюції мікроорганізмів: зб. наук. пр. – К.: Логос, 2016. – Т. 19. – С. 188–191.
20. Юр'єва О.М., Курченко І.М., Сирчін С.О., Харкевич О.С., Павличенко А.К., Наконечна Л.Т. Целюлазна та ксиланазна активність ендофітних і ґрунтових штамів *Penicillium funiculosum* Thom // Мікробіологічний журнал. – 2016. – Т. 78, № 5. – С. 75–82.
21. Jorgensen H., Olsson L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT20888 – effect of substrate on hydrolytic performance // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2006. – 38, № 3–4. – P. 381–390. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.06.018.
22. Maeda R.N., Barcelos C.A., Santa Anna L.M., Pereira N.Jr. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation // *J Biotechnol* – 2013. – 163, № 1. – P. 38–44. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.10.014.
23. Ramani G., Meera B., Vanitha C., Rajendhran J., Gunasekaran P. Molecular cloning and expression of thermostable glucose-tolerant β-glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1 in *Pichia pastoris* and its characterization // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2015. – 42, № 4. – P. 553–565. doi: 10.1007/s10295-014-1549-6.

YURIEVA O.M.¹, GRYGANSKYI A.P.², SYRCHIN S.O.¹, NAKONECHNA L.T.¹, PAVLYCHENKO A.K.¹, KURCHENKO I.M.¹

¹ D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Zabolotny str., 154, e-mail: elenayurieva@ukr.net

² L.F. Lambert Spawn Co., USA, Coatesville, Pennsylvania

CELLULOLYTIC AND XYLANOLYTIC ENZYME COMPLEX OF *PENICILLIUM FUNICULOSUM* THOM

Aim. The aim of this research was a comparative study of β-glucosidase activity of endophytic and soil *Penicillium funiculosum* strains. **Methods.** β-Glucosidase activity was determined by hydrolysis of pNPG on 4th and 6th days of cultivation. Barcoding of *P. funiculosum* 16795 DNA was carried out with ITS1 and ITS4 primers. **Results.** Obtained data demonstrate the ability of endophytic and soil *P. funiculosum* strains to synthesize β-glucosidase activity and hydrolyze Na-CMC and wheat straw. Studied activities enhanced with increasing cultivation time of micromycetes. Endophytic isolates of *P. funiculosum* had higher β-glucosidase activities than soil ones. **Conclusions.** *P. funiculosum* strains, especially 16795, are promising for further research of β-glucosidase preparations as additional component to the *T. reesei* enzymes, as well as to create recombinant constructs for obtaining a balanced composition of cellulolytic enzyme complexes.

Keywords: *Penicillium funiculosum*, β-glucosidase activity, endophytes, soil strains.