

КОМПЛЕКС ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНИХ І КСИЛАНОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ *PENICILLIUM FUNICULOSUM* THOM

Целюлозолітичні ферментні комплекси мікроскопічних грибів відіграють важливу роль у біодеградації рослинних субстратів. Ці ферменти широко застосовуються в різних галузях промисловості, зокрема у виробництві миючих засобів, ферментованих цукрів і біоетанолу другого покоління, а також кормів для тварин [1, 2]. Відомо, що основним продуцентом лігноцелюлозних ферментних препаратів є мутантний штам *Trichoderma reesei*, однак високі значення гідролітичної активності на синтетичних целюлозних субстратах не дозволяють отримати значний рівень деградації лігноцелюлозної біомаси [3], а тому виникає потреба використання додаткових ферментів [4, 5]. Природні ізоляти роду *Penicillium* здатні до синтезу лігно- та целюлозолітичних ферментів із вищою продуктивністю, ніж *T. reesei* [6].

Дані, отримані за допомогою транскриптомного та секретомного аналізу, вказують на синтез більшої кількості целюлозолітичних ферментів у природних штаммах мікроскопічних грибів порівняно з *T. reesei*. Інші дані свідчать про ширший спектр целюлаз при індукції лігноцелюлозними субстратами [7]. Подібну закономірність помічено для деяких штамів *Penicillium* – активність лігно- і целюлозолітичних ферментних комплексів у ході застосування сільськогосподарських відходів як індукторів була значно вищою, ніж під час використання очищеної целюлози.

Це свідчить про різні механізми регуляції експресії генів, що кодують ці ферменти. Можливість використання дешевих та доступних природних субстратів для більш ефективного синтезу ферментативних комплексів дає перевагу для використання грибів роду *Penicillium* у сучасних технологіях отримання мультиферментних препаратів [7]. Особливий інтерес викликає *Penicillium funiculosum*, що має збалансований целюлозолітичний комплекс та високу β -глюкозидазну активність [8].

Penicillium funiculosum Thom широко розповсюджений у ґрунті, на рослинних субстратах, технічних матеріалах. Він продукує гідролітичні ферменти, стимулятори росту рослин, характеризується антибактеріальною, антифунгальною і противірусною дією [9].

P. funiculosum входить до складу комплексу ендоефітів рослин сфагнових боліт Полісся України [10, 11]. Про симбіоз рослин з ендоефітними грибами відомо ще з нижнього девону, саме їх вважають рушійною силою еволюції рослинного світу [12]. За мутуалістичних відносинах ендоефітні організми синтезують комплекс біологічно активних метаболітів, у тому числі й целюлозолітичні ферменти [8, 13–18]. У цих видів відбувається активація целюлазної активності особливо на рослинних залишках, що свідчить про їх участь у процесах трансформації природної целюлози [17]. Оскільки відомості щодо фізіолого-біохімічних особливостей ендоефітів практично відсутні, важливим є порівняльне дослідження целюлозолітичної і ксиланазної активності ендоефітних і ґрунтових штамів *P. funiculosum*.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були 16 ендоефітних (біотрофи) і ґрунтових (сапрофіти) штамів *P. funiculosum* із колекції культур мікроскопічних грибів відділу фізіології та систематики мікрорісцевих Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Посівний матеріал вирощували на картопляно-глюкозному середовищі в колбах Ерленмейєра об'ємом 750 мл в глибинних умовах (210–230 об/хв) за температури $26 \pm 2^\circ\text{C}$ протягом 48 год. Культивування мікрорісцевих здійснювали в зазначених вище умовах протягом 6 діб у рідкому середовищі Чапека з додаванням 0,5 % Na-КМЦ як єдиного джерела вуглецю [19].

Ендоглюканазну активність визначали за гідролізом 2,0 % розчину Na-КМЦ після 30 хв інкубації 0,5 мл культурального фільтрату (КФ)

з 0,5 мл субстрату за температури 50°C та рН 4,5 [20]. Екзоглюканазну активність визначали за гідролізом фільтрувального паперу (ФП), додаючи до нього 1 мл КФ відповідного штаму та 0,05 М цитратного буфера (рН 4,5), час інкубації – 1 год за температури 50°C [20]. Ксиланазну активність визначали за гідролізом 0,18 мл 1 % розчину букового ксилану (Sigma) у 0,05 М цитратному буфері (рН 4,5) з 0,02 мл КФ за температури 50°C протягом 5 хв [19]. Кількість редуруючих цукрів визначали за використанням 3,5-динітросаліцилової кислоти (ДНС метод) [21].

Ферментативні активності визначали на 4 і 6 доби росту [19]. За одиницю ендо-, екзоглюканазної і ксиланазної активності приймали таку кількість ферменту, яка за заданих умов утворювала 1 мкмоль глюкози або ксилози на 1 мл КФ за 1 хв.

Для статистичної обробки даних використовували статистичний пакет Microsoft Excel.

Результати та обговорення

Встановлено, що всі штами *P. funiculosum*, ізольовані з різних еконіш, здатні гідролізувати синтетичний субстрат Na-КМЦ. Ендофітні і ґрунтові штами характеризувались ендоглюканазною активністю на 4-ту та 6-ту доби культивування (рис. 1). Максимальну ендоглюканазну активність спостерігали на 6-ту добу, винятки становили ендофітні штами *P. funiculosum* 16784, 16786 і 16795, а також ґрунтовий 16791, активність якого була вищою на 4-ту добу. Ендоглюканазна активність ґрунтових штамів була у 1,5–2,5 разів вищою, ніж у ендофітів. У ендофітних штамів ця активність становила $0,01 \pm 0,005 \div 0,04 \pm 0,003$ од/мл, для ґрунтових – $0,015 \pm 0,002 \div 0,1 \pm 0,005$ од/мл відповідно та була значно нижчою порівняно з *Fusarium* sp., *Fennellia* sp. і *Trichoderma* sp. [22].

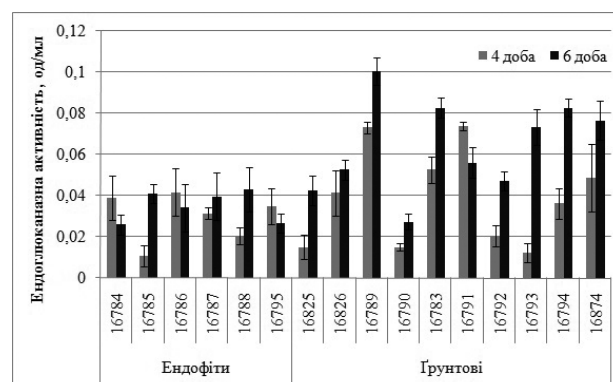


Рис. 1. Ендоглюканазна активність штамів *P. funiculosum* з різних еконіш

Екзоглюканазна активність досліджених штамів *P. funiculosum* не перевищувала $0,027 \pm 0,004$ од/мл та була значно нижчою, ніж у *Fennellia* sp. ($0,15 \pm 0,02 \div 0,45 \pm 0,06$ од/мл) [22]. Для ендофітних штамів максимальна екзоглюканазна активність досягала $0,018 \pm 0,002$ од/мл, для ґрунтових – $0,027 \pm 0,004$ од/мл (рис. 2).

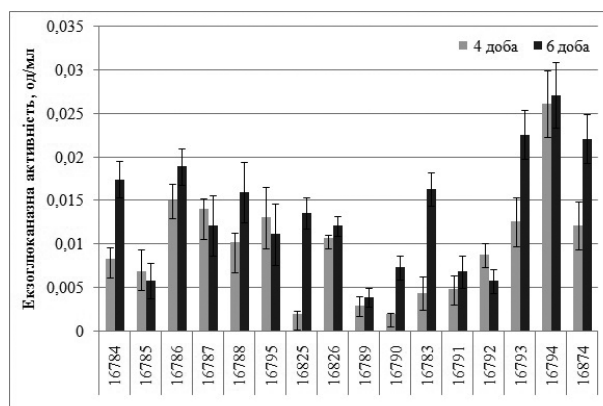


Рис. 2. Екзоглюканазна активність штамів *P. funiculosum* з різних еконіш

Ксиланазна активність ізолятів *P. funiculosum*, як і у випадку ендо- та екзоглюканазної, зростала зі збільшенням терміну культивування (рис. 3). Ендофітні штами виявили в 1–2,7 рази нижчу ксиланазну активність, ніж ґрунтові. Межі варіювання ксиланазної активності для ендофітних штамів склали $0,15 \pm 0,03 \div 0,28 \pm 0,02$ од/мл, у той час як у ґрунтових – $0,23 \pm 0,02 \div 0,78 \pm 0,04$ од/мл. Ґрунтовий ізолят *P. funiculosum* 16825 характеризувався максимальним рівнем ксиланазної активності $0,78 \pm 0,04$ од/мл. Відомо, що ксиланазна активність штаму *Fusarium* sp. становила

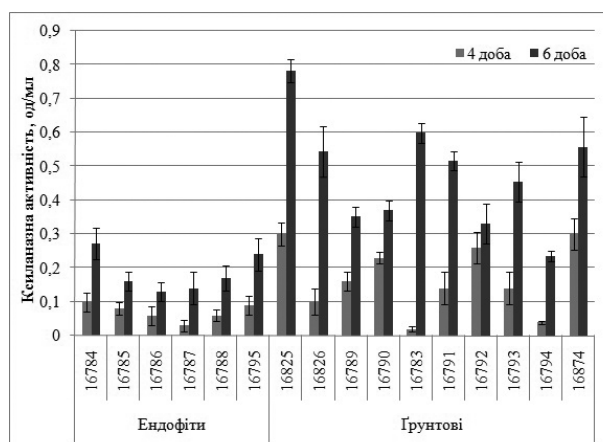


Рис. 3. Ксиланазна активність штамів *P. funiculosum* з різних еконіш

3,0±0,4 од/мл, *Fennellia* sp. – 8,0±0,03 од/мл, а у *Trichoderma* sp. досягала 16,0±0,6 од/мл та була в 3–20 рази вищою, ніж у досліджених ендоефітних і ґрунтових ізолятів *P. funiculosum* [22]. За умов культивування мікроміцетів *P. funiculosum* на середовищі з Na-КМЦ як єдиним джерелом вуглецю, екзо-, ендоглюканазна та ксиланазна активності зростали із збільшенням терміну культивування.

Невисокі рівні целюлазної активності досліджених штамів *P. funiculosum*, одержані за умов їх культивування на середовищі з Na-КМЦ, можна пояснити низькою індукцією синтезу целюлозолітичних ферментів аморфною целюлозою. Так, відомо, що рівень загальної целюлазної активності деяких штамів роду *Penicillium* під час вирощування на середовищі з пшеничною соломою був подібним до такого у світового продуцента *Trichoderma reesei* RutC30, однак штами *Penicillium* мали нижчі рівні ксиланазної активності, ніж штами *Trichoderma* [6]. Подібний факт встановлено для штамів *Fennellia flavipes* і *Fusarium oxysporum* на середовищах із використанням природних рослинних субстратів як єдиного джерела вуглецю, їх загальна целюлазна активність була вищою, ніж на середовищі з фільтрувальним папером [23].

Отримані нами експериментальні дані щодо синтезу штамами *P. funiculosum* з різних еконіш

комплексів целюлозолітичних ферментів узгоджуються з даними інших авторів. Зокрема, ендоефітні гриби *Aspergillus niger* DR02, *Trichoderma atroviride* DR17 і DR19, *Alternaria* sp. DR45, *Annulohyphoxylon stigyum* DR47 та *Talaromyces wortmanii* DR49, виділені з різних видів рослин, продукують комплекс гідролітичних ферментів [17].

Висновки

Отримані нами експериментальні дані свідчать про здатність ендоефітних і ґрунтових штамів *P. funiculosum* синтезувати комплекс целюлозо- і ксиланолітичних ферментів та гідролізувати синтетичний субстрат Na-КМЦ. Досліджені активності зростали зі збільшенням терміну культивування грибів. Ендоефітні ізоляти *P. funiculosum* мали нижчу екзо-, ендоглюканазну та ксиланазну активність, ніж ґрунтові ізоляти. Встановлений факт синтезу гідролітичних ферментів ендоефітними і сапрофітними штамами *P. funiculosum* дозволить у подальшому використовувати їх для пошуку продуцентів комплексів гідролаз та розробки сучасних біотехнологій трансформації лігноцелюлозних субстратів.

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

ЛІТЕРАТУРА

- 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.
- 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. of Biotechnol. – 2013. – 163, N 1. – P. 38–44.
- Gusakov A.V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production // Trends Biotechnol. – 2011. – 29, № 9. – P. 419–425.
- Jovanovic I, Magnuson J.K., Collart F., Robbertse B., Adney W.S., Himmel M.E., Baker S. Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocellulose: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies // Cellulose. – 2009. – 16, N 4. – P. 687–697.
- Krogh K.B.R., Morkeberg A., Jorgensen H., Frisvad J.C., Olsson L. Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2004. – 114, N 1. – P. 389–401.
- Marjamaa K., Toth K., Bromann P.A., Szakacs G., Kruus K. Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocellulosics // Enzyme Microb. Technol. – 2013. – 52, № 6–7. – P. 358–369.
- Liu G., Zhang L., Wei G., Qui Y. Ma L, Li J., Zheng H., Wang S., Wang C., Xun L., Zhao G.P., Zhou Z., Qu Y. Genomic and secretomic analyses reveal unique features of the lignocellulolytic enzyme system of *Penicillium decumbens*. – 2013. – PloS One 8: e55185. Doi: 10.1371/journal.pone.0055185. pmid:23383313.
- 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 // J. of Biotechnol. – 2011. – 46, N 5. – P. 1196–1201.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H. Compendium of soil fungi. – [Second edition]. – Eching: IHW-Verlag, 2007. – 672 p.
- Курченко І.М. Біорізноманітність та еколого-фізіологічні особливості ендоефітних мікроміцетів рослин сфагнових боліт Полісся України: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. біол. наук: спец. 03.00.07 «Мікробіологія». – К., 2014. – 40 с.

11. Жданова Н.Н., Захарченко В.А., Василевская А.И., Школьный А.Т., Кучма Н.Д., Артышкова Л.В., Садовников Ю.С., Вембер В.В., Наконечная Л.Т., Курченко И.Н., Соколова Е.В., Орлов А.А., Редчиц Т.И., Желтоножский В.А., Садовников Л.В., Лашко Т.Н., Желтоножская М.В., Гродзинская А.А., Сырчин С.А., Вассер С.П., Карпенко Ю.В., Павличенко А.К., Олишевская С.В., Тугай Т.И. Микобиота Украинского Полесья: последствия Чернобыльской катастрофы. – К.: Наук. думка, 2013. – 383 с.
12. Krings M., Taylor T.N., Dotzler N. Fungal Endophytes as a Driving Force in Land Plant Evolution: Evidence from the Fossil Record. – In: Biocomplexity of Plant-Fungal Interactions / D. Southworth (ed.). – Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2012. – P. 5–27.
13. Rodriguez R.J., White J.F., Arnold A.E., Redman R.S. Fungal endophytes: Diversity and functional roles // *New Phytologist*. – 2009. – 182, N 2. – P. 314–330.
14. 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, N 2. – P. 151–158.
15. Adejuwon A.O., Oni A.O., Ajayi A.A., Olutiola P.O. Cellulase activity in tomato fruits infected with *Penicillium funiculosum* Thom // *African Journal of Plant Science*. – 2009. – 3, N 5. – P. 113–116.
16. Ribeiro L.F.C. Ribeiro L.F., Jorge J.A., Polizeli M.L.T.M. Screening of filamentous fungi for xylanases and cellulases not inhibited by xylose and glucose // *British Biotechnology Journal*. – 2014. – 4, N 1. – P. 30–39.
17. Robl D., da Silva Delabona P., Mergel C.M., Rojas J.D., Costa P.S., Pimentel I.C., Vicente V.A., Pradella J.G.C., Padilla G. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes // *BMC Biotechnology*. – 2013. – 13: 94, N 10. – P. 1–12.
18. Wykhan J.P.N., Leagale P.B. Saccharification of wastepaper mixtures with cellulose from *Penicillium funiculosum* // *Biotechnology Letters*. – 2001. – 23, N 22. – P. 1849–1852.
19. Методи експериментальної мікології: Справочник / под ред. В.И. Билай. – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.
20. Ghose T.K. Measurement of cellulase activities // *Pure and Applied Chemistry*. – 1987. – 59, N 2. – P. 257–268.
21. Miller G.I. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars // *Analytical Chemistry*. – 1959. – 31, N 3. – P. 426–428.
22. Syrchin S.O. Kharkevich O.S., Pavlichenko A.K., Yurieva O.M., Nakonechna L.T., Nekleva Yu.S., Kurchenko I.M. Extracellular cellulolytic complexes production by microscopic fungi // *Biotechnologia Acta*. – 2015. – 8, N 5. – P. 78–85.
23. Чепчак Т.П. Олишевская С.В., Курченко И.Н. Целлюлозолитическая активность штаммов *Fennellia flavipes* и *Fusarium oxysporum* // *Микробиологический журнал*. – 2013. – 75, N 6. – С. 51–58.

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

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

CELLULOLYTIC AND XYLANOLYTIC ENZYME COMPLEX OF *PENICILLIUM FUNICULOSUM* THOM

Aim. The aim of this research was a comparative study of cellulase and xylanase activities of endophytic and soil *Penicillium funiculosum* strains. **Methods.** Endoglucanase activity was determined by hydrolysis of 2.0% solution of Na-CMC, exoglucanase – filter paper and xylanase – beech xylan. Reducing substances were estimated using DNS method. **Results.** Obtained data demonstrate the ability of endophytic and soil *P. funiculosum* strains to synthesize complex of cellulolytic and xylanolytic enzymes and hydrolyze the synthetic substrate Na-CMC. Studied activities enhanced with increasing cultivation time of micromycetes. Endophytic isolates of *P. funiculosum* had lower exo-, endoglucanase and xylanase activities than soil ones. **Conclusions.** The fact that endophytic and saprophytic *P. funiculosum* strains synthesize hydrolytic enzymes allows screening them further for producers of hydrolytic enzyme complexes and development of modern biotechnology transformation of lignocellulosic substrates.

Keywords: *Penicillium funiculosum*, endophytes, saprophytes, cellulase and xylanase activities.