

Сирчін С.О., Павличенко А.К., Харкевич О.С., Наконечна Л.Т.,
Юр'єва О.М., Курченко І.М.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
вул. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

ОПТИМІЗАЦІЯ СКЛАДУ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ЗА МЕТОДОМ ПЛАКЕТТА-БЕРМАНА ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ ЦЕЛЮЛОЛІТИЧНОГО КОМПЛЕКСУ *FENNELIA* SP. 2806

Мета. Оптимізація складу середовища культивування аскоміцета *Fennellia* sp. 2806 для підвищення синтезу ферментів целюлазного комплексу з використанням методу Плакетта-Бермана; вивчення можливості застосування даного методу для підвищення синтезу компонентів мультиферментного целюлозодеградуючого комплексу. **Методи.** У роботі використовували спеціалізовані методи математичної статистики та методи визначення екзо-, ендоглюканазної та ксиланазної активностей за редуруючими цукрами. **Результати.** Оптимізація складу поживного середовища дозволила підвищити активність ферментів целюлазного комплексу *Fennellia* sp. 2806: ендоглюканазної – у 1,2, екзоглюканазної – 2,2, ксиланазної – 2,4 рази порівняно з вихідним поживним середовищем. Встановлено фактори, що мали найбільший вплив на кожну з досліджених активностей: сечовина, KH_2PO_4 , пшенична солома, KCl , $CoCl_2$. **Висновки.** Застосування методу Плакетта-Бермана є ефективним при оптимізації складу поживного середовища для синтезу мультиферментних целюлолітичних комплексів мікроскопічними грибами.

Ключові слова: ендоглюканаза, екзоглюканаза, ксиланаза, *Fennellia* sp., метод Плакетта-Бермана.

На сьогодні целюлази широко застосовуються у багатьох галузях, зокрема, сільському господарстві, тваринництві, текстильній та целюлозопаперовій промисловості, а також у виробництві біоетанолу другого покоління. Потреба у цих ферментах продовжує зростати [13, 29].

До складу целюлолітичного ферментативного комплексу входять принаймні три типи ферментів – екзо- та ендоглюканазні і β -глюкозидази, що здатні послідовно гідролізувати целюлозу до оліго- та моноцукрів [28]. Важливу роль у трансформації природних целюлозовмісних матеріалів відіграють також і геміцелюлази, головним чином ксиланазні ендо-типу [27].

Основними продуцентами целюлаз і ксиланаз є мікроскопічні гриби – представники відділу Ascomycota родин Нуростреасеє (р. *Trichoderma*) і Тріхосомасеє (рр. *Aspergillus* і *Penicillium*). Найбільш комерційно успішним продуцентом целюлаз та ксиланаз є *Trichoderma reesei* RUT-C30 (телеоморфа *Hypocrea jecorina*), отриманий шляхом багатостадійного мутагенезу, проте цей штам має ряд суттєвих недоліків, серед яких низький рівень синтезу окремих компонентів целюлолітичного комплексу – β -глюкозидази, тому до його геному було введено додаткові гени з *Aspergillus aculeatus*. Крім того, *T. reesei* має низький рівень експресії літичних

полісахарид монооксигеназ (LPMO), що обумовлює їх використання з інших джерел (*Thermoascus aurantiacus*) [10, 11, 19].

Дослідження, проведені на рівні транскриптомного та секретомного аналізу, показали, що природні штами, на відміну від відомих делеційних мутантів та рекомбінантних продуцентів, секретують більш широкий спектр целюлолітичних ферментів, особливо на лігноцелюлозних матеріалах [3, 14, 15, 24].

Невисока питома продуктивність рекомбінантних штамів і низька ефективність гідролізу природних лігноцелюлозних матеріалів ферментними комплексами, що ними продукуються, вказує на необхідність пошуку нових природних продуцентів, базуючись на інших критеріях відбору, а саме – не за максимальними значеннями канонічних целюлозних активностей, а за максимальною здатністю до трансформації лігноцелюлозних субстратів.

Раніше нами було відібрано перспективний штам *Fennellia* sp. 2806, здатний до синтезу та секреції збалансованого за складом целюлазного комплексу і ксиланази при рості на відходах сільського господарства – пшеничній соломі [25, 26].

Динаміка росту культури і синтез продуктів метаболізму мікроскопічними грибами значною мірою визначаються такими компонентами поживного середовища, як джерела вуглецю, азоту та неорганічні солі [2]. Тому підбір складу поживного середовища є важливим етапом дослідження оптимальних умов індукції і синтезу целюлолітичних ферментів.

Класичний метод оптимізації складу поживного середовища культивування полягає у проведенні однофакторних експериментів, в яких змінюється концентрація одного з компонентів, у той час як інші підтримуються на фіксованому рівні. Однак, одновимірні експерименти з підбору компонентів середовища не гарантують визначення оптимальних умов. Використання методів математичної статистики надає значні переваги порівняно з класичним підходом – «один фактор – один експеримент». Проведення експериментів з одночасним варіюванням усіх можливих факторів (повні факторні експерименти) є практично неможливим внаслідок необхідності проведення великої кількості дослідів. Статистичні методи оптимізації складу середовища культивування за допомогою спеціально розроблених планів дозволяють запобігти недолікам зазначених вище підходів та звести до мінімуму похибки у визначенні ефектів варіабельних факторів за мінімальної кількості дослідів. Одним з них є план за Плакеттом-Берманом (Plackett–Burman design), який будується на основі ортогональної матриці Адамару (Hadamard matrix) і добре зарекомендував себе в експериментах з оптимізації складу середовищ для продуцентів різноманітних гідролаз. Статистичний метод Плакетта-Бермана є насиченим дворівневим ортогональним факторним планом 2^{k-p} типу, що вивчає ефект k змінних у $k+1$ варіантах експерименту, якщо k кратне 4 [5, 6]. Цей метод застосовується для початкового скринінгу компонентів поживного середовища з метою вивчення їх впливу на продукцію цільового ферменту і відбору значущих факторів для подальшої оптимізації.

У той же час, метод Плакетта-Бермана практично не використовувався для експериментів з оптимізації синтезу таких багатокомпонентних ферментативних комплексів, як целюлолітичні, за умов глибинного росту

на природних субстратах. Слід зазначити, що на сьогодні немає універсального за складом поживного середовища для синтезу целюлаз грибами, тому його оптимізація може значно підвищити активність ферментів целюлазного комплексу.

Не зважаючи на наявність консервативних гомологічних послідовностей регуляторних факторів транскрипції генів целюлаз в геномах більшості досліджених грибів, деякі види аскоміцетів мають незалежні механізми регуляції синтезу целюлаз на рівні транскрипції відповідно до специфічних індукторів целюлаз і геміцелюлаз. Тому важливим є підбір оптимальних умов синтезу целюлаз для конкретного штаму. Виходячи з викладеного, метою наших досліджень було проведення оптимізації компонентів середовища культивування аскоміцета *Fennellia* sp. з використанням методу Плакетта-Бермана та вивчення можливості застосування даного методу для оптимізації синтезу комплексу целюлолітичних ферментів і ксиланази.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження був штам мікроскопічного гриба *Fennellia* sp. 2806 з колекції відділу фізіології і систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, попередньо відібраний за здатністю до синтезу комплексу целюло- та ксиланолітичних ферментів [25]. Культуру вирощували на картопляно-глюкозному агарі протягом 10–14 діб за температури 22–26°C.

Інокулюм вирощували на картопляно-глюкозному середовищі в глибинних умовах (210–230 об/хв) за температури 22–26°C протягом 48 год в колбах Ерленмейера об'ємом 750 мл.

Культивування мікроміцета для визначення целюлолітичної активності проводили в глибинних умовах (210–230 об/хв) за температури 22–26°C протягом 4 діб в колбах Ерленмейера об'ємом 750 мл. Об'єм поживного середовища складав 200 мл, кількість інокулюму – 5%. Після завершення культивування міцелій гриба та залишки субстрату відділяли фільтруванням. Отриманий культуральний фільтрат (КФ) використовували для визначення целюлолітичної і ксиланазної активностей.

Склад поживного середовища (г/л): подрібнена пшенична солома – 5,0; NaNO₃ – 2,0; KH₂PO₄ – 1,0; KCl – 0,5; MgSO₄ × 7 H₂O – 0,5; FeSO₄ × 7 H₂O – 0,01; дистильована вода – 1 л.

Оптимізація складу поживного середовища методом Плакетта-Бермана.

Для встановлення значущих компонентів поживного середовища використано 12 речовин (к) у двох концентраціях: мінімальній – «–» і максимальній – «+» (табл. 1). Отриману експериментальну матрицю представлено у таблиці 2. Аналіз результатів для кожного фактору проводили за лінійним рівнянням першого порядку [5]:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + e,$$

де y – очікувана величина ферментативної активності в КФ *Fennellia* sp. 2806; X – фактор (компонент поживного середовища); i – порядковий но-

мер фактору від 1 до k ; β_0 – вільний коефіцієнт; β_i – коефіцієнт i -го фактору, e – похибка моделі.

Таблиця 1

Компоненти поживного середовища в матриці Плакетта-Бермана

№	код	Назва речовини	Мінімальна концентрація («-»), г/л	Максимальна концентрація («+»), г/л
1	A	Подрібнена пшенична солома	2	10
2	B	Подрібнені стебла кукурудзи	2	10
3	C	Сечовина	2	20
4	D	Пептон	0,1	0,5
5	E	Дріжджовий екстракт	1	5
6	F	KH_2PO_4	1	4
7	G	NaNO_3	1	5
8	H	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,05	0,5
9	I	CoCl_2	0,01	1
10	J	KCl	0,2	2
11	K	MgSO_4	0,25	1
12	L	Мікроелементи ($\text{MnSO}_4 + \text{FeSO}_4$)	0,001 + 0,005	0,01 + 0,02

Всі варіанти поживного середовища досліджували в трьох повторностях. Кожен коефіцієнт β було оцінено на статистичну достовірність, і, відповідно до цього, визначено ті компоненти поживного середовища, що мали достовірний вплив на величину целюлолітичної активності КФ *Fennellia* sp. 2806 [6].

Ендоглюканазну активність визначали за гідролізом 2,0% розчину Na-КМЦ після 30 хв інкубації 0,5 мл КФ з 0,5 мл субстрату за температури 50°C і рН 4,5 [9].

Екзоглюканазну активність визначали за гідролізом фільтрувального паперу (ФП), додаючи до нього по 1 мл КФ і 0,05 М цитратного буфера (рН 4,5). Час інкубації – 1 год за температури 50°C [9].

Ксиланазну активність визначали за гідролізом 0,18 мл 1% розчину букового ксилану (Sigma) у 0,05 М цитратному буфері (рН 4,5) і 0,02 мл КФ за температури 50°C протягом 5 хв [30].

Редукуючі речовини в реакційній суміші після ферментативного гідролізу ФП, Na-КМЦ або букового ксилану визначали з ДНС реактивом [18].

За одиницю ендо-, екзоглюканазної активностей приймали таку кількість ферменту, яка в заданих умовах утворювала 1 мкмоль глюкози на 1 мл КФ за 1 хв. **За одиницю ксиланазної активності** приймали таку кількість ферменту, яка в заданих умовах за 1 хв утворювала 1 мкмоль ксилози на 1 мл КФ відповідно.

Статистичну обробку даних, побудову планів експериментів та їх математичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення MiniTab 16 (Minitab Inc.). Рівень значущості $p > 0,1$ розглядався як достовірний для змінних, що використовувались у дослідях.

Результати. Більшість середовищ, що використовуються для синтезу целюлолітичних ферментів, містять ряд основних компонентів. Оскільки целюлази і ксиланози є строго індукцибельними ферментами, середовище має містити індуктори синтезу, найбільш активними серед яких є лігно-

целюлозні природні матеріали [27]. Дріжджовий екстракт містить амінокислоти і вітаміни та є важливим компонентом поживних середовищ для культивування мікроскопічних грибів. Пептон є комплексним джерелом вуглецю, азоту і факторів росту та входить до складу більшості середовищ, які використовуються для синтезу целюлаз і ксиланаз. Відомо, що додавання пептону у концентрації 0,5–1,0% підвищує синтез целюлаз грибами. Встановлено, що органічні і неорганічні джерела азоту та природні субстрати позитивно впливають на ферментативну активність целюло- і геміцелюлолітичних комплексів [12].

У досліджах використовували такі неорганічні джерела азоту – $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ і NaNO_3 . KH_2PO_4 , крім джерела мінеральних речовин, є буферним агентом і позитивно впливає на синтез целюлаз. Включення до складу середовища CoCl_2 обумовлено даними щодо значного підвищення целюлазної активності *T. reesei* і деяких видів роду *Aspergillus* [23].

Таблиця 2

**Експериментальна матриця за методом Плакетта-Бермана
для 12 компонентів поживного середовища**

№	Компоненти поживного середовища												Ферментативна активність, од/мл		
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	КМЦазна	ФПА	Ксиланазна
1	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	0,013 ± 0,014	0,019 ± 0,029	0,2 ± 0,31
2	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	0,062 ± 0,099	0,015 ± 0,015	8,3 ± 12,83
3	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	0,000 ± 0,000	0,001 ± 0,001	0,6 ± 1,07
4	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	0,040 ± 0,055	0,010 ± 0,013	5,9 ± 2,78
5	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	0,037 ± 0,017	0,022 ± 0,005	5,7 ± 5,56
6	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	0,004 ± 0,002	0,008 ± 0,005	1,3 ± 2,23
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,093 ± 0,074	0,014 ± 0,006	14,6 ± 7,64
8	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	0,056 ± 0,049	0,009 ± 0,004	5,3 ± 4,61
9	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	0,041 ± 0,026	0,011 ± 0,009	5,6 ± 6,55
10	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	0,006 ± 0,007	0,006 ± 0,010	1,2 ± 1,13
11	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	0,022 ± 0,016	0,023 ± 0,011	10,4 ± 12,11
12	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	0,088 ± 0,071	0,018 ± 0,009	12,6 ± 7,78
13	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	0,004 ± 0,007	0,012 ± 0,011	1,5 ± 1,32
14	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	0,038 ± 0,051	0,016 ± 0,015	4,2 ± 2,39
15	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	0,006 ± 0,005	0,001 ± 0,001	2,2 ± 2,03
16	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	0,333 ± 0,065	0,069 ± 0,012	82,4 ± 20,10
17	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	0,004 ± 0,005	0,002 ± 0,003	0,6 ± 0,85
18	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	0,274 ± 0,084	0,045 ± 0,021	56,5 ± 16,80
19	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	0,005 ± 0,005	0,004 ± 0,002	8,7 ± 2,89
20	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	0,198 ± 0,141	0,039 ± 0,010	40,6 ± 27,14

Примітка:

A – солома пшенична

B – кукурудза

C – сечовина

D – пептон

E – дріжджовий екстракт

F – KH_2PO_4

G – NaNO_3

H – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

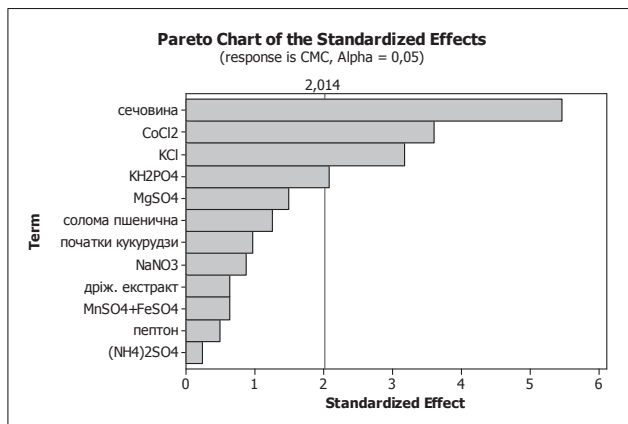
I – CoCl_2

J – KCl

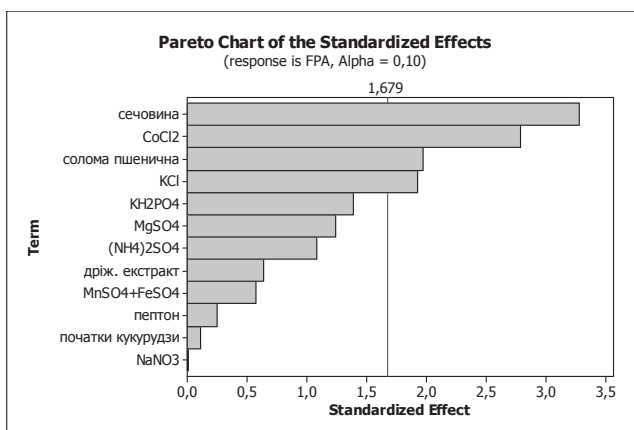
K – MgSO_4

L – мікроелементи

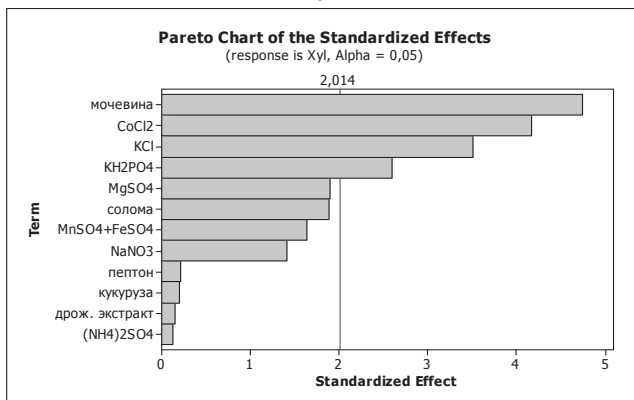
Ферментативна активність вихідного середовища: ендоглюканазна – $0,284 \pm 0,042$, екзоглюканазна – $0,031 \pm 0,030$, ксиланолітична – $32,1 \pm 8,80$ од/мл.



a



б



в

Рис. 1. Діаграма Парето оцінки достовірності впливу різних компонентів поживного середовища на ферментативну активність *Fennellia* sp. 2806: а – ендоглюканазу, б – екзоглюканазу, в – ксиланазу.

Аналіз отриманих результатів показав, що на ендоглюканазу активність *Fennellia* sp. 2806 найбільшою мірою впливали сечовина, CoCl₂, KCl і KH₂PO₄ (у порядку зменшення впливу) (рис. 1). На екзоглюканазу активність цього гриба з 95% достовірністю впливали сечовина і CoCl₂, з

90% достовірністю – пшенична солома і KCl. Перші дві речовини мали значний негативний ефект на целюлолітичну активність *Fennellia* sp. 2806, у той час як у *Trichoderma reesei* RUT C-30 CoCl₂ сприяв її індукції [17, 19]. Пшенична солома, KCl і KН₂PO₄ позитивно впливали на активність *Fennellia* sp. 2806. Як і у випадку ендоглюканазної активності, на ксиланазну впливали сечовина, CoCl₂, KCl і KН₂PO₄ (у порядку зменшення впливу) з 95% достовірністю та пшенична солома і MgSO₄ – з 90%. Всі інші компоненти поживного середовища в досліджених діапазонах достовірно не впливали на рівень ферментативних активностей, що дозволяє використовувати їх в подальших дослідженнях у мінімальних кількостях.

Обговорення. Останнім часом метод Плакетта-Бермана отримав широке розповсюдження для оптимізації умов синтезу екстрацелюлярних гідролаз [21]. Більшість досліджень показали позитивні результати, проте цей метод використовували, головним чином, для підвищення целюлазної активності за одним з показників. Нами вперше досліджено можливість використання даного методу для підвищення активності мультиферментного целюлозодеградуючого комплексу *Fennellia* sp. 2806. Складність підходу полягає у тому, що, незважаючи на більш, ніж піввікову історію досліджень, механізм індукції целюлазного і ксиланазного комплексів лишається не повністю встановленим. Відкриття все більшої кількості ортологічних транскрипційних факторів регуляції лише ускладнює створення універсальної схеми індукції [14, 24]. Так, лактоза – один з основних неспецифічних індукторів синтезу целюлаз *T. reesei* і деяких інших аскоміцетів, не проявляла активності у випадку *Fennellia* sp. 2806 [25]. Такий же ефект спостерігали і для CoCl₂, який входить до складу більшості варіантів середовищ для синтезу целюлаз.

У наших попередніх дослідженнях показано, що *Fennellia* sp. 2806 утилізує важкодоступні природні субстрати. Пшенична солома і стебла кукурудзи були індукторами синтезу збалансованого комплексу целюлаз і геміцелюлаз, що узгоджується з даними інших авторів [1].

Як правило, головним значущим компонентом поживного середовища для мікроскопічних грибів є джерело вуглецю, у нашому випадку це складні гемі- і целюлозовмісні субстрати – пшенична солома і стебла кукурудзи. Пшенична солома виявилась значущим фактором для екзоглюканазної і ксиланазної активностей з достовірністю 90%, в той час як для ендоглюканазної активності джерела природної целюлози були незначущими. Пшенична солома була кращим індуктором синтезу целюлолітичних ферментів *Fennellia* sp. 2806, ніж стебла кукурудзи.

Вплив факторів азотного живлення різнився за ефектами. Так, у складі поживного середовища було досліджено 5 різних азотовмісних речовин. Серед них – органічної природи: пептон і дріжджовий екстракт; неорганічні: амонійний – сечовина і (NH₄)₂SO₄ та нітратний азот – NaNO₃. З них лише сечовина мала значний негативний вплив на целюлолітичну активність *Fennellia* sp. 2806, що може бути пов'язано з надвеликими кількостями азотного живлення у ферментаційному середовищі. Таким чином, показано можливість застосування одночасно кількох джерел вуглецю та азоту різної природи для синтезу ферментів целюлазного комплексу *Fennellia* sp. 2806, але С:N баланс і взаємодія цих компонен-

тів поживного середовища потребує подальшого дослідження. Внаслідок значного негативного впливу CoCl_2 на досліджені ферментативні активності та належності до важких і токсичних металів, було вирішено надалі виключили цей компонент зі складу поживного середовища.

Концентрація джерел вуглецю та фосфору є особливо важливою для синтезу ферментів целюлазного комплексу мікроскопічними грибами. Так, не зважаючи на те, що більшість дослідників зазначають позитивний вплив обох факторів, як показано на прикладі *T. reseei* RUT-C30, ефект значною мірою залежить від природи джерела вуглецю, індуктора синтезу ферментів комплексу і способу культивування мікроскопічного гриба [4, 8, 16, 19, 20, 22].

Тенденція зростання похибки даних у діапазоні низьких рівнів целюлолітичної і ксиланазної активностей *Fennellia* sp. 2806 не дозволяє побудувати достовірну (90%) математичну модель, тому нами було визначено лише головні чинники процесу. Комплексний склад і неоднорідність структури використаних природних джерел вуглецю можуть впливати як на ріст аскоміцета, так і на індукцію синтезу целюлолітичного комплексу, та бути головною причиною складності побудови достовірної математичної моделі процесу.

Метод Плакетта-Бермана загалом використовувався лише для оптимізації активності деяких компонентів ферментативного комплексу біотрансформації лігноцелюлози, що секретуються в середовище за глибинних умов культивування [8]. Недолік цього підходу полягає у тому, що ефекти, отримані для одного з досліджених ферментів мультиферментної системи, потребують валідації для системи у цілому.

Більшість досліджень з оптимізації синтезу целюлолітичних ферментів проводились в умовах твердофазної ферментації, які важко порівнювати з умовами глибинного культивування. Так, оптимізація целюлазу *Penicillium purporgenium* виявила, що досліджені фактори проявляли різноспрямовані ефекти на активність компонентів целюлазного комплексу гриба. Наприклад, дріжджовий екстракт позитивно впливав на ендоглюканазну активність, негативно – на β -глюкозидазну та мав нейтральний ефект щодо екзоглюконазної [7]. Головними чинниками впливу в умовах твердофазної ферментації є не склад середовища, а кількість інокулюму та вологість субстрату [7, 12, 20].

У випадку *Fennellia* sp. 2806 значна подібність індукції енто-, екзоглюканазної та ксиланазної активностей дозволяють обрати оптимальне середовище саме для ферментного комплексу, що дозволяє визнати перспективними подальші дослідження з оптимізації синтезу ферментів комплексу шляхом варіювання компонентів поживного середовища. У той же час підбір оптимального складу поживного середовища для мультиферментної системи може виявитись непростим завданням, вирішення якого буде залежати не лише від правильного вибору факторів поживного середовища, але й від особливостей регуляції синтезу компонентів комплексу ферментів у конкретного продуцента.

Таким чином, встановлено, що найбільш значущими компонентами поживного середовища для синтезу целюлолітичного комплексу *Fennellia* sp. 2806 були сечовина, CoCl_2 , KCl і KH_2PO_4 з достовірністю 95% – для ендоглюканазної активності; сечовина, CoCl_2 , KCl і подрібнена

пшенична солома з достовірністю 90% – для екзоглюканазної активності; сечовина, CoCl_2 , KCl , KH_2PO_4 , подрібнена пшенична солома і MgSO_4 з достовірністю 90% – для ксиланазної активності. В результаті оптимізації відібрано середовище № 16 (табл. 2), яке забезпечувало максимальне підвищення ферментативних активностей *Fennellia* sp. 2806 порівняно з вихідним поживним середовищем: ендоглюканазної – у 1,2, екзоглюканазної – 2,2, ксиланазної – 2,4 рази.

Значущі компоненти поживного середовища для синтезу ферментів целюлолітичного комплексу *Fennellia* sp. 2806, визначені методом Плакетта-Бермана, дозволять провести подальшу оптимізацію за допомогою тривірневих методів поверхні відгуку, що здатні враховувати ефекти взаємодії факторів.

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

*Сырчин С.А., Павличенко А.К., Харкевич Е.С., Наконечная Л.Т.,
Юрьева Е.М., Курченко И.Н.*

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ МЕТОДОМ ПЛАКЕТТА-БЕРМАНА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА *FENNELIA* SP. 2806

Резюме

Цель. Оптимизация состава среды культивирования аскомицета *Fennellia* sp. 2806 для повышения синтеза ферментов целлюлазного комплекса с использованием метода Плакетта-Бермана; изучение возможности применения данного метода для повышения синтеза компонентов мультиферментного целлюлозодеградирующего комплекса. **Методы.** В работе использовали специализированные методы математической статистики и методы определения экзо-, ендоглюканазной и ксиланазной активностей по образованию редуцирующих сахаров. **Результаты.** Оптимизация состава питательной среды позволила повысить активность ферментов целлюлолитического комплекса *Fennellia* sp. 2806: ендоглюканазной – в 1,2, екзоглюканазной – 2,2, ксиланазной – 2,4 раза по сравнению с исходной питательной средой. Установлены значимые факторы, которые имели наибольшее влияние на каждую из исследованных активностей: мочевины, KH_2PO_4 , пшеничная солома, KCl , CoCl_2 . **Выводы.** Метод Плакетта-Бермана показал свою эффективность при оптимизации состава питательной среды для повышения синтеза мультиферментного целлюлолитического комплекса *Fennellia* sp. 2806.

Ключевые слова: ендоглюканаза, екзоглюканаза, ксиланаза, *Fennellia* sp., метод Плакетта-Бермана.

**COMPOSITION OPTIMIZATION OF THE NUTRIENT MEDIUM BY
PLAKETT-BERMAN DESIGN FOR INCREASING THE ENZYME ACTIVITY
OF CELLULOLYTIC COMPLEX OF *FENNELIA* SP. 2806**

Summary

Aim. Optimization of the nutrient medium components of ascomycete *Fennellia* sp. 2806 to increase the synthesis of cellulolytic enzyme complex using Plackett-Burman factorial design; study of the possibility of using this method to increase the synthesis of components of cellulolytic multienzyme complex. **Methods.** Methods of statistical design and determination of exo-, endoglucanase and xylanase activities by determining the release of reducing sugars were used. **Results.** Composition optimization of the nutrient medium increased the enzyme activities of cellulolytic complex of *Fennellia* sp. 2806: endoglucanase – 1.2 times, exoglucanase – 2.2, xylanase – 2.4 compared to the initial medium. The significant factors that had the greatest impact on each of the investigated activities were determined: urea, of KH_2PO_4 , wheat straw, KCl, CoCl_2 . **Conclusions.** Plackett-Burman design was successfully employed for the composition optimization of the nutrient medium to increase the synthesis of multienzyme cellulolytic complex of *Fennellia* sp. 2806.

Keywords: endoglucanase, exoglucanase, xylanase, *Fennellia* sp, Plackett-Burman design.

1. Acharya PB, Acharya DK, Modi HA. Optimization for cellulose production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate. Afr J Biotechnol. 2008;7(22):4147-52.
2. Bilay VI. [Basis of general mycology] – Kiev: High school, 1989.
3. Borin GP, Sanchez CC, de Souza AP, de Santana ES, de Souza AT, Leme AFP, et al. Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. PloS ONE. 2015;10(6):e0129275.
4. Dashtban M, Buchkowski R, Qin W. Effect of different carbon sources on cellulose production by *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) strains. Int J Biochem Mol Biol. 2011;2(3):274-86.
5. Dejaegher B, Vander Heyden Y. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. J Pharm Biomed Anal. 2011;56(2):141-58.
6. Draper NR. Plackett and Burman Designs. In: Kotz S, editor. Encyclopedia of Statistical Sciences. 2nd Ed. John Wiley & Sons; 2006. V.9. p. 6161-4.
7. El-Metwally MM. Statistical response to different fermentation parameters in rapid production of cellulose by *Penicillium purpurgenum* MA1 in solid state fermentation of rice hulls. Res J Microbiol. 2014;9(5):221-31.
8. Gahda AY, Berekaa MM. Improved production of endoglucanase enzyme by *Aspergillus terreus*; application of Plackett-Burman design for optimization of process parameters. Biotechnology. 2009;8(2):212-9.
9. Ghose TK. Measurement of Cellulase Activities. Pure & Appl Chem. 1987;59(2): 257-68.

10. Gusakov AV. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. Trends Biotechnol. 2011;29(9):419-25.
11. Hemsworth GR, Henrissat B, Davies GJ, and Walton PH. Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases. Nat Chem Biol. 2014;10:122-6. doi:10.1038/nchembio.1417.
12. Ho HL, Ak Sali S. Bioprocessing of agricultural residuals for the optimum production of extracellular xylanase by *Aspergillus brasiliensis* in solid state fermentation (SsF). J Biodivers Biopros Dev. 2014;1(2):1-15. doi:10.4172/2376-0214.1000121.
13. Kuhad RC, Gupta R, Singh A. Microbial cellulases and their industrial applications. Enzyme Research. 2011;2011:1-10. doi:10.4061/2011/280696.
14. Linger JG, Taylor LE, Baker JO, Decker SR. A constitutive expression system for glycosyl hydrolase family 7 cellobiohydrolases in *Hypocrea jecorina*. Biotechnology for Biofuels. 2015;8(1):45.
15. Liu G, Zhang L, Wei X, Zou G, Qin Y, Ma L, et al. Genomic and secretomic analyses reveal unique features of the lignocellulolytic enzyme system of *Penicillium decumbens*. PloS One. 2013;8(2):e55185. doi:10.1371/journal.pone.0055185.
16. Manisya ZAW, Madidah S, Faridah Yu, Mohammed IAK, Zahangir A. Factor affecting endoglucanase production by *Trichoderma reesei* RUT C-30 from solid state fermentation of oil palm empty fruit bunches using Plackett-Burman desing. Afr J Biotechnol. 2011;10(46):9402-9. doi: 10.5897/AJB11.008.
17. Maurya DP, Vats S, Rai S, Negi S. Optimization of enzymatic saccharification of microwave pretreated sugarcane tops through response surface methodology for biofuel. Indian J Exp Biol. 2013;51(11):992-6.
18. Miller GI. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal Chem. 1959;31(3):426-8.
19. Peterson R, Nevalainen H. *Trichoderma reesei* RUT-C30 – thirty years of strain improvement. Microbiology. 2012;158(1):58-68. doi: 10.1099/mic.0.054031-0.
20. Rashid SS, Alam MZ, Karim MIA, Salleh MH. Optimization of nutrient suppliants for cellulose production with the basal medium palm oil mill effluent. World academy of science, engineering and technology. 2009;36:811-817.
21. Saravanan P, Muthuvelayudham R, Virythagiri T. Application of statistical design for cellulose by *Trichoderma reesei* using mango peel. Enzyme Res. 2012;2012:1-7.
22. Segato F, Damásio AR, de Lucas RC, Squina FM, Prade RA. Genomics Review of Holocellulose Deconstruction by *Aspergillus*. Microbiol Mol Biol Rev. 2014;78(4):588-613.
23. Sharma R, Kocher GS, Bhogal RS, Oberoi HS. Cellulolytic and xylanolytic enzymes from thermophilic *Aspergillus terreus* RWY. J Basic Microbiol. 2014;54(12):1367-77.
24. Singh A, Taylor LE II, Vander Wall TA, Linger J, Himmel ME, Podkaminer K, et al. Heterologous protein expression in *Hypocrea jecorina*: a historical perspective and new developments. Biotechnol Adv. 2015;33:142-54. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.11.009.
25. Syrchin SO, Kharkevych OS, Pavlychenko AK, Yurieva OM, Nakonechna LT, Nekleva YuS, et al. Extracellular cellulolytic complexes production by microscopic fungi. Biotechnologia Acta. 2015;8(5):78-85. doi:10.15407/biotech8.05.078.
26. Syrchin SO, Kharkevych OS, Pavlychenko AK, Yurieva OM, Nakonechna LT, Pasik YuS, et al. [Biosynthesis peculiarities of extracellular cellulases and xylanase by

- Fennellia flavipes* M.J. Wiley et E.G. Simmons]. Factors in experimental evolution of organisms. 2014;15:137-40. http://nbuv.gov.ua/UJRN/feeo_2014_15_34. Ukrainian.
27. Zhang J, Viikari L. Impact of xylan on synergistic effects of xylanases and cellulases in enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014;174:1393-1402. doi 10.1007/s12010-014-1140-7.
 28. Zhang XZ, Zhang YHP. Cellulases: characteristics, sources, production, and applications. In: Shang-Tian Yang editors. *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers*. Wiley. 2013; Ch.8, p.131-46.
 29. Zhang YHP, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol Adv*. 2006;24:452-81. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.03.003.
 30. Zhang YHP, Hong J, Ye X. Cellulase Assays. *Biofuels: Methods and Protocols*. In: Mielenz JR, editor. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press. 2009;581:213-31. doi 10.1007/978-1-60761-214-8_14.

Отримано 10.10.2016