

**Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова**  
Химический факультет

Телицин Вадим Дмитриевич

**Разработка новых ферментных препаратов с  
оптимизированным составом и изменёнными свойствами  
индивидуальных ферментов**

1.5.6. Биотехнология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

*Научные руководители:*

к.х.н. Семёнова М.В.

к.х.н. Сеницына О.А.

Москва

2025

# Оглавление

Список сокращений .....	4
Введение.....	7
Обзор литературы.....	12
1. Растительная биомасса и целлюлозосодержащее сырьё (ЦСС) .....	12
1.1. Основные источники ЦСС .....	12
1.2. Состав клеточной стенки растений .....	13
1.3. Компонентный состав различных видов ЦСС .....	17
1.4. Предварительная обработка ЦСС .....	19
2. Современные представления о механизме ферментативной деструкции растительной биомассы.....	23
2.1. Основные компоненты ферментного комплекса <i>Penicillium verruculosum</i> .....	23
2.2. Механизм ферментативной деструкции целлюлозы .....	28
3. Методы увеличения эффективности процесса биодegradации целлюлозы .....	31
3.1. Анализ основных методов увеличения эффективности гидролиза .....	31
3.2. Рациональный дизайн грибных целлюлаз.....	34
3.3. Свойства дегликозилированных форм ЦБГ 1д и ЭГ2д <i>P.verruculosum</i> .....	37
Экспериментальная часть.....	40
4. Объекты исследования и методики экспериментов .....	40
4.1. Ферментные препараты (ФП) .....	40
4.2. Ферменты .....	41
4.3. Субстраты .....	41
4.4. Реактивы .....	42
4.5. Получение культуральных жидкостей (КЖ) и сухих препаратов .....	42
4.6. Хроматографические сорбенты и системы .....	43
4.7. Методы определения активности ферментов и концентрации белка .....	43
4.8. Ферментативный гидролиз ЦСС .....	44
4.9. Определение состава низкомолекулярных сахаров .....	45
4.10. Выделение и очистка индивидуальных ферментов .....	45
4.11. Анализ состава ФП методом денситометрии .....	46
4.12. Анализ состава ФП методом тонкого хроматографического фракционирования.....	46
4.13. Идентификация ферментов .....	47
4.14. Определение адсорбционной способности ферментов .....	47
Результаты и обсуждение.....	48
5. Характеристика используемых ферментов .....	48

5.1. Выделение индивидуальных ферментов .....	48
5.2. Свойства индивидуальных ферментов .....	52
6. Сравнение гидролитической способности индивидуальных целлюлаз .....	56
7. Синергизм между основными (ЭГ, ЦБГ) и вспомогательными (ПМО, БГЛ) ферментами целлюлазного комплекса .....	60
8. Гидролиз ЦСС смесями индивидуальных ферментов .....	67
8.1. Гидролиз микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) .....	67
8.2. Гидролиз сульфатной небеленой лиственной целлюлозы (СНЛЦ).....	70
8.3. Гидролиз сульфатной небеленой хвойной целлюлозы (СНХЦ).....	73
8.4. Гидролиз тростника, предобработанного щелочью (ЩТ).....	75
9. Получение и свойства новых ФП, содержащих дегликозилированные формы ЦБГ1д и ЭГ2д и гетерологичную ЭГ1 .....	79
9.1. Скрининг КЖ рекомбинантных штаммов .....	79
9.2. Активность новых ФП .....	83
9.3. Состав ФП, содержащих ЦБГ1д, ЭГ2д и ЭГ1 .....	86
10. Свойства ФП, содержащего вспомогательные ферменты (ПМО и БГЛ) .....	90
11. Гидролитическая способность новых целлюлолитических ФП .....	92
11.1. Результаты гидролиза различных видов ЦСС .....	92
11.2. Возможность осуществления процесса биоконверсии ЦСС при использовании сверхвысоких концентраций субстрата.....	97
Заключение .....	100
Выводы.....	101
Список литературы .....	102
Приложение 1 .....	120
Приложение 2 .....	130
Приложение 3 .....	134
Приложение 4.....	138
Приложение 5 .....	145

## Список сокращений

### Ферменты:

АКГ – арабиноксилан-арабинофурангидролаза *Penicillium canescens*

БГЛ –  $\beta$ -глюкозидаза *Aspergillus niger*

КсилЕ – ксиланаза Е *P.canescens*

ПМО – полисахаридмонооксигеназа *P.verruculosum*

ЦБГ – целлобиогидролаза

ЦБГ1д – дегликозилированная (мутантная) N194А форма целлобиогидролазы 1 *P.verruculosum*

ЦБГ1н – исходная (нативная) форма целлобиогидролазы 1 *P.verruculosum*

ЭГ – эндоглюканаза

ЭГ1 – эндоглюканаза 1 *Trichoderma reesei*

ЭГ2д – дегликозилированная (мутантная) N45А форма эндоглюканазы 2 *P.verruculosum*

ЭГ2н – исходная (нативная) форма эндоглюканазы 2 *P.verruculosum*

### Препараты:

В1-537 – лабораторный препарат на основе штамма *P.verruculosum*  $\Delta$ niaD

PV-ПМО – лабораторный препарат на основе рекомбинантного штамма *P.verruculosum* с высоким содержанием гомологичной ПМО

PV-БГЛ – лабораторный препарат на основе рекомбинантного штамма *P.verruculosum* с высоким содержанием гетерологичной БГЛ

PV-ПМО-БГЛ – лабораторный препарат на основе рекомбинантного штамма *P.verruculosum* с высоким содержанием гомологичной ПМО и гетерологичной БГЛ

PV-ЦБГ1д – лабораторный препарат на основе рекомбинантного штамма *P.verruculosum* с высоким содержанием мутантной ЦБГ1д

PV-ЭГ2д – лабораторный препарат на основе рекомбинантного штамма *P.verruculosum* с высоким содержанием мутантной ЭГ2д

PV-ЦБГ1д-ЭГ2д – лабораторный препарат на основе рекомбинантного штамма *P.verruculosum* с высоким содержанием мутантных ЦБГ1д и ЭГ2д

PV-ЦБГ1д-ЭГ1 – лабораторный препарат на основе рекомбинантного штамма *P.verruculosum* с высоким содержанием мутантной ЦБГ1д и гетерологичной ЭГ1

PV-ЭГ1-ЭГ2д – лабораторный препарат на основе рекомбинантного штамма *P.verruculosum* с высоким содержанием гетерологичной ЭГ1 и мутантной ЭГ2д

PV-ЭГ1-БГЛ – лабораторный препарат на основе рекомбинантного штамма *P.verruculosum* с высоким содержанием гетерологичных ЭГ1 и БГЛ

PСА-ЦБГ1д – лабораторный препарат на основе рекомбинантного штамма *P.canescens* с высоким содержанием мутантной ЦБГ1д

PСА-ЭГ2д – лабораторный препарат на основе рекомбинантного штамма *P.canescens* с высоким содержанием мутантной ЭГ2д

#### Субстраты:

ДМФ – диметоксифенол

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза

МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза

*n*-НФ-β-Глк – *para*-нитрофенил-β-глюкозид

СНЛЦ – сульфатная небелёная лиственная целлюлоза

СНХЦ – сульфатная небелёная хвойная целлюлоза

ЩТ – предобработанный щёлочью тростник

#### Прочее:

ВС – восстанавливающие сахара

ДДС-ПААГ – полиакриламидный гель в присутствии додецилсульфата натрия

ИЖ – ионные жидкости

ИК – индекс кристалличности

КЖ – культуральная жидкость

МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

РС – реакционная способность

СП – степень полимеризации

ФП – ферментный препарат

ЦСМ – целлюлозосвязывающий модуль

ЦСС – целлюлозосодержащее сырьё

## Введение

**Актуальность темы исследования.** Возобновляемая растительная биомасса является альтернативным источником энергии и биотоплива (биоэтанол и биобутанол). Кроме того, переработка растительной биомассы позволяет получать разнообразные коммерчески востребованные продукты. Важным этапом превращения биомассы в полезные продукты является гидролиз входящих в её состав полисахаридов (в первую очередь целлюлозы) в моносахариды с помощью ферментных препаратов, получаемых с использованием различных микроскопических грибов. Недостаточная активность таких ферментных препаратов является одним из препятствий для масштабирования технологий биоконверсии растительной биомассы.

Продуцентами наиболее эффективных многокомпонентных ферментных препаратов (ФП) для деструкции целлюлозосодержащего сырья (ЦСС) являются микроскопические грибы из родов *Trichoderma* и *Penicillium*. Их целлюлазные комплексы содержат в своем составе «классический» набор гидролаз трех типов: эндоглюканаз (ЭГ), целлобиогидролаз (ЦБГ) и  $\beta$ -глюкозидаз (БГЛ). Глубина ферментативного гидролиза целлюлозы и состав продуктов её деструкции зависят от сбалансированности состава целлюлазного комплекса и уровня активности его индивидуальных компонентов.

Эффективность осахаривающей способности целлюлазных комплексов можно увеличить с помощью подбора оптимального состава ферментов комплекса, а также добавления в его состав новых ферментов, например, полисахаридмонооксигеназы (ПМО). Для увеличения активности индивидуальных ферментов и улучшения их эксплуатационных характеристик активно применяются методы генетической и белковой инженерии, позволяющие вносить аминокислотные замены в структуру ферментов.

**Степень разработанности темы исследования.** Ранее в нашей лаборатории были получены мутантные формы ЦБГ1 и ЭГ2 *P.verruculosum* с заменой одного из сайтов гликозилирования (ЦБГ1д и ЭГ2д). Эти мутации положительно повлияли на каталитические свойства ферментов, проведённые предварительные испытания показали большую эффективность мутантных форм при гидролизе различных видов ЦСС. Однако, не было исследовано поведение мутантных форм в совокупности с другими “основными” (ЦБГ2, ЭГ1) и вспомогательными целлюлазами (БГЛ, ПМО) в ходе глубокого гидролиза ЦСС, не была проведена оптимизация состава ферментного комплекса на основе данных по осахариванию различных субстратов и, как результат, не был получен ФП на основе продуцента целлюлаз гриба *P.verruculosum*, содержащий необходимые целевые ферменты.

**Цели и задачи работы.** Целью данной работы являлась оптимизация состава целлюлазного комплекса гриба *P.verruculosum* и улучшение свойств основных ферментов,

входящих в его состав, методами генетической инженерии для получения ФП с высокой осахаривающей способностью.

Поставленные задачи:

1. Получить ферментные препараты (ФП), содержащие мутантные формы ЦБГ1д и ЭГ2д с увеличенной удельной активностью. Выделить в индивидуальном виде мутантные формы.
2. Провести сравнительное изучение гидролитической способности индивидуальных мутантных и нативных форм ЦБГ1 и ЭГ2, а также других основных ферментов целлюлазного комплекса (ЦБГ2 *P.verruculosum* и ЭГ1 *T.reesei*).
3. Изучить наличие и возможность синергетического взаимодействия между целлюлолитическими ферментами различной специфичности и определить наиболее активные смеси индивидуальных ферментов для осахаривания ЦСС.
4. Оптимизировать состав ферментного комплекса за счёт включения вспомогательных ферментов (ПМО, БГЛ).
5. Получить ФП, содержащие вспомогательные ферменты, и ФП, содержащие “основные” ферменты.
6. Проанализировать осахаривающую способность новых ФП, содержащих мутантные формы ЦБГ1д и ЭГ2д, с использованием препаратов вспомогательных ферментов (ПМО, БГЛ) при биоконверсии различных видов ЦСС.

**Объекты и предмет исследования.** В качестве объектов исследования выступают выделенные в индивидуальном виде нативные ЦБГ2 *P.verruculosum*, ПМО *P.verruculosum*, ЭГ1 *T.reesei*, БГЛ *A.niger*, нативные и мутантные формы ЦБГ1 и ЭГ2 *P.verruculosum* и препараты, содержащие эти ферменты в различных комбинациях. Предметом исследования является гидролитическая способность ферментов и ФП в индивидуальном виде и в смесях по отношению к разным видам ЦСС.

**Научная новизна.** В работе впервые предложено использование дегликозилированных форм основных целлюлаз гриба *P.verruculosum* (ЦБГ1д и ЭГ2д) и ЭГ1 *T.reesei*, выделенных в индивидуальном виде, для глубокой деструкции целлюлозы, изучено взаимодействие этих ферментов с вспомогательным ферментом ПМО, а также определено оптимальное соотношение данных ферментов для проведения эффективного осахаривания ЦСС. Были получены новые ФП на основе гриба *P.verruculosum*, содержащие дегликозилированные формы ЦБГ1д и ЭГ2д и гетерологичную ЭГ1 *T.reesei*.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Исследование способов увеличения осахаривающей способности ферментных целлюлазных комплексов микроскопических грибов за счёт улучшения свойств индивидуальных ферментов и

оптимизации состава комплекса открывает широкие перспективы для создания более эффективных лабораторных и промышленных целлюлазных препаратов. Полученные в диссертационной работе данные позволяют подобрать оптимальное соотношение ферментов и условия проведения гидролиза для превращения различных видов ЦСС в сахара.

**Методология и методы исследования.** В рамках данной работы были использованы следующие методы и подходы: определение ферментативных активностей к ряду полимерных субстратов – микрокристаллической целлюлозе (МКЦ), карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ), ксилану бука, ксилоглюкану тамаринда, арабиноксилану пшеницы, низкомолекулярных синтетических субстратов – *n*-нитрофенил- $\beta$ -глюкозиду (*n*-НФ- $\beta$ -Глк), 2,6-диметоксифенолу (2,6-ДМФ), определение концентрации белка методом Лоури, хроматографические методы получения ферментов в индивидуальном виде, определение состава ФП с помощью тонкого хроматографического фракционирования, идентификация ферментов и анализ состава ФП с помощью ПААГ-электрофореза и МАЛДИ масс-спектрометрии, проведение ферментативного гидролиза различных видов ЦСС.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Дегликозилированные формы ферментов ЦБГд и ЭГ2д показывают лучшую гидролитическую способность по отношению к МКЦ, сульфатной небелёной лиственной целлюлозе (СНЛЦ), сульфатной небелёной хвойной целлюлозе (СНХЦ) и предобработанному щёлочью тростнику (ЩТ) по сравнению с их нативными формами (ЦБГ1н и ЭГ2н).
2. ПМО проявляет синергетическое взаимодействие с индивидуальными ЦБГ1н, ЦБГ2, ЭГ1 и ЭГ2н, причем оно наиболее выражено в начальный период гидролиза. Добавление небольшого количества ПМО (10–15%) в состав целлюлазного комплекса, сформированного из ЦБГ1н, ЭГ2н и БГЛ, увеличивает выход сахаров на 10–20% при длительном гидролизе МКЦ.
3. Оптимальная композиция из очищенных ферментов состоит из ЦБГ1д, ЦБГ2, ЭГ2д и/или ЭГ1, БГЛ и ПМО. Присутствие этих ферментов в реакционной смеси обеспечивает наибольший выход восстанавливающих сахаров (ВС) в процессе гидролиза различного ЦСС.
4. Использование ФП, содержащего оба вспомогательных фермента (ПМО и БГЛ), при добавлении его к препарату основных целлюлаз, содержащего ЦБГ1д и ЭГ1, приводит к глубокой конверсии различных видов ЦСС до сахаров (степень конверсии составляет 76–89%). Данная смесь препаратов оказывается эффективна при гидролизе сверхвысоких концентраций СНЛЦ, СНХЦ и ЩТ (до 300 г/л).

**Личный вклад автора.** В работах, опубликованных в соавторстве, значительный вклад (более 30%) принадлежит автору. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя была определяющей. Автор самостоятельно изучил современные литературные данные по теме исследования и на основании изученных работ составил литературный обзор, сформулировал цели и задачи работы. Автор самостоятельно или при непосредственном участии выполнил все эксперименты. Автор самостоятельно собрал, обработал и проанализировал полученные данные, сформулировал выводы по проделанной работе, принимал участие в написании всех статей.

**Степень достоверности.** Достоверность полученных экспериментальных данных обеспечена выполнением работы с помощью точных инструментальных методов, проведением повторных и контрольных измерений и обработкой полученных данных методом математической статистики. Научные положения и практические рекомендации, сформулированные в данной диссертации, обоснованы экспериментальными данными, которые проиллюстрированы в представленных таблицах и графиках. Основные результаты диссертации опубликованы в международных и российских научных журналах.

**Апробация результатов.** Результаты работы были представлены на всероссийских и международных научных конференциях и выставках: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019», Россия, 2019; 5-th European Congress of Applied Biotechnology, Италия, 2019; Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020», Россия, 2020; Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022», Россия, 2022; Международная научная конференция «Биокатализ 2023», Россия, 2023.

**Публикации.** Результаты диссертационной работы опубликованы в 9 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

**Связь работы с государственными программами.** Работа выполнена при поддержке следующих проектов:

"Технологическая платформа БРИКС для создания интегрированных устойчивых биопроцессов получения биотоплива и сопутствующих продуктов из сельскохозяйственных отходов. Акроним: BEST: Возобновляемая биоэнергетика на основе экологически безопасных технологий" (РФФИ, 2018-2020)

"Исследования по подбору оптимальных условий гидролиза тростника" (Договор 01-05 от 10.05.2023)

Гос. задание МГУ "Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды" (№ 121041500039-8)

«Подбор оптимальных ферментных комплексов для получения простых сахаров из целлюлозосодержащего сырья» (Договор 0290/2022/1041 от 04.03.2022).

# Обзор литературы

## 1. Растительная биомасса и целлюлозосодержащее сырьё (ЦСС)

### 1.1. Основные источники ЦСС

Значительная часть органического материала на Земле (порядка 2000 млрд т.) приходится на целлюлозосодержащую биомассу. Это почти бесконечный источник возобновляемого сырья, однако на данный момент его энергетический потенциал слабо освоен несмотря на огромные перспективы, которые открываются от его использования. В качестве источников для получения биотоплива можно использовать различные пищевые продукты, содержащие крахмал, например зерно. Однако использование подобных источников нецелесообразно до тех пор, пока не решены вопросы продовольственной безопасности бедных слоев населения мира. Особый интерес вызывает биотопливо второго поколения, получаемое из различных отходов деревообрабатывающего, сельскохозяйственного и целлюлозо-бумажного производств, а не из пищевых продуктов, как биотопливо первого поколения [1]. В год отходов такого рода производится порядка 3,5 млрд тонн. По сравнению с этим разведанные запасы нефти, газа и угля составляют 215 млрд т, 250 трлн м<sup>3</sup> и 1069 млрд т соответственно [2-3]. Однако это невозобновляемые ресурсы, содержание которых в земной коре конечно, тогда как биотопливо второго поколения производится из потенциально неисчерпаемого источника.

Использование целлюлозосодержащего сырья (ЦСС) в качестве источника энергии не приводит к высвобождению и попаданию в природу ископаемого углерода и является более экологичным способом получения топлива. Глюкоза и прочие сахара являются основными продуктами переработки вторичного ЦСС (отходов). Они являются основными источниками для получения биотоплива второго поколения (биоэтанола, биодизеля и биобутанола) – перспективной и экологичной замены традиционных источников сырья. Помимо получения биотоплива возобновляемые источники сырья можно использовать для получения различных химических соединений. Часть этих соединений традиционно получают нефтехимическим синтезом, и замена источника получения этих соединений на продукты биотехнологических производств является значимой частью современных стратегий устойчивого развития и биоэкономики. К таким соединениям относятся органические кислоты, аминокислоты, этилен, этиленгликоль, этаноламин, спирты, диолы, фураны, сложные эфиры, алкены, алканы, акрилаты, полимеры (включая биodeградебельные), смолы, кормовые продукты [4-10].

Перечень отходов деревообработки довольно велик. Они занимают первое место по объёму невостребованной биомассы. К ним относится всё то, что не идёт в дальнейшее производство, а именно пни, кора, ветви (четверть от общего количества древесины), опилки (до

12%) и прочие обрезки (до 20%). Их скапливание и последующая утилизация с целью освобождения производственных площадей является серьёзной экономической проблемой [1].

Сельскохозяйственное производство является ещё одним глобальным источником ЦСС. К отходам данного вида производства относится всё, что не идёт в производство пищи, тканей или кормов, а именно избытки соломы, зерновая шелуха (четверть от общей массы зерна) с мукомольных заводов и различные продукты обработки льна или других растений, используемых для производства тканей. Обычно они либо сжигаются, либо просто остаются гнить [11]. Наиболее интересным сельскохозяйственным отходом является свекловичный жом (20% сухой массы от переработанной свеклы), который представляет собой невостребованные части сахарной свеклы [12]. Сахара, содержащиеся в нём, не могут быть извлечены классическим способом, который заключается в обессахаривании свекловичной стружки методом диффузии. Таким образом большое количество потенциального сырья для получения сахаров скапливается в качестве отходов на сахарных производствах.

Ещё одним источником отходов, содержащих целлюлозу, являются различного рода источники бумаги. Сюда входят как макулатура и бумажный мусор, создаваемый в процессе жизнедеятельности людей, так и отходы от производства бумаги на целлюлозно-бумажных комбинатах.

## 1.2. Состав клеточной стенки растений

Растительная клетка снаружи покрыта многокомпонентной клеточной стенкой. Наиболее важную роль в её структуре играют полисахариды, различающиеся строением, составом и свойствами, следовательно, своей ролью и функцией внутри клеточной стенки (рис. 1) [13]. К неполисахаридным компонентам клеточной стенки относятся лигнин, отвечающий за одревеснение клетки, и различные структурные белки [14, 15].

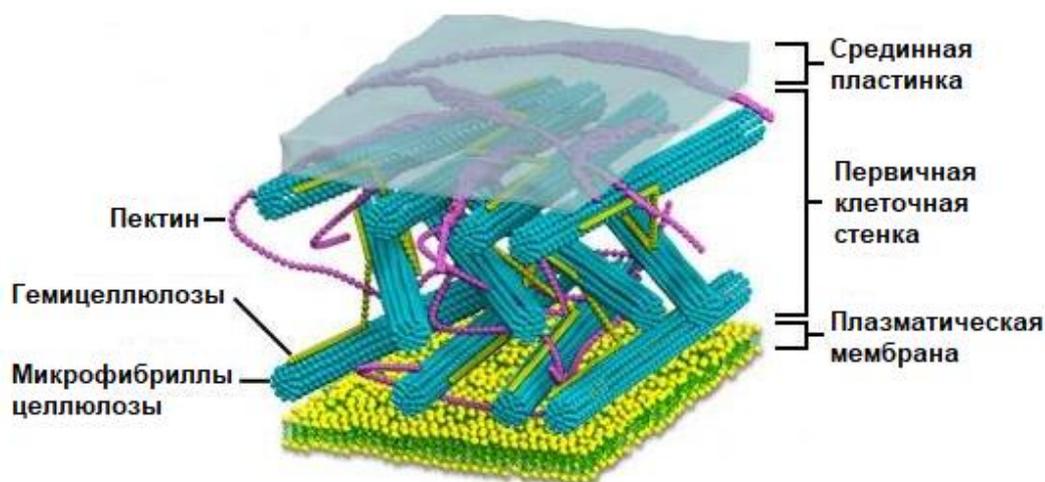


Рисунок 1. Строение клеточной стенки растений.

**Целлюлоза** – основной структурный компонент клеточной стенки. Она представляет собой молекулы глюкозы, связанные с помощью  $\beta$ -1,4-гликозидной связи в длинную линейную цепочку высокой степени упорядоченности. Количество гликозидных звеньев (остатков глюкозы) довольно велико и доходит порой до 15000. Индивидуальная молекула целлюлозы способна достигать 2-3 мкм в длину и иметь массу более 1,5 млн Да [16]. Молекулы целлюлозы способны связываться между собой с помощью нековалентных взаимодействий (в первую очередь водородных) с образованием громоздких надмолекулярных структур – микрофибрилл. Поскольку взаимодействие между различными молекулами целлюлозы происходит в случайных местах цепи, то микрофибриллы способны достигать сотен микрометров в длину за счет участия тысяч цепочек целлюлозы в её формировании [17].

Микрофибриллы на большей части своей длины представляют собой однонаправленный упорядоченный жёсткий кристалл, для которого характерна высокая протяжённость и химическая инертность. Однако внутри микрофибрилл присутствуют более реакционноспособные, более рыхлые и менее упорядоченные аморфные зоны [18, 19]. Такая структура микрофибрилл позволяет молекулам целлюлозы быть достаточно химически устойчивыми. Внутри клеточной стенки микрофибриллы целлюлозы окружены более аморфными пектином и гемицеллюлозами. Чередование данных зон является важным свойством для целлюлозы. Соотношение аморфных и кристаллических зон можно описать с помощью индекса кристалличности (ИК). Чем выше значение ИК, тем хуже целлюлоза подвергается воздействию различных химических агентов, в том числе ферментов [20].

**Гемицеллюлозы** – полисахариды, в основе которых находятся как пентозы (ксилоза и арабиноза), так и гексозы (галактоза, манноза, редко глюкоза) и уроновые кислоты, обычно связанные  $\beta$ -1,4-связями. Довольно часто они имеют аморфную разветвлённую структуру и в рамках одной цепи могут иметь разный набор моносахаридов [14].

Роль гемицеллюлоз в клеточной стенке растений заключается в образовании матрикса, который скрепляет и удерживает все прочие компоненты (целлюлозу, пектин, лигнин) вместе, образуя как ковалентные, так и нековалентные связи. Больше всего их встречается в листьях и стеблях быстрорастущих растений (до 85% от общего состава полисахаридов клеточной стенки). В лиственной и хвойной древесине их состав может варьироваться от 25 до 40%, а в различных бумажных отходах, чей состав претерпел изменение в результате различных физических и химических взаимодействий, составляет 10–20% [21].

Большую часть гемицеллюлоз составляют полимеры на основе ксилана. Его цепь формируют остатки D-ксилопиранозы (рис. 2А), связанные гликозидными  $\beta$ -1,4-связями. Около 70% этих остатков ацетилированы по С2- или С3-атому углерода. В качестве боковых групп в гетерополимере ксилана часто выступают 4-О-метил- $\alpha$ -D-глюкуроновая кислота (рис. 2Б) или  $\alpha$ -

L-арабинофураноза (рис. 2В). Для первой характерно присоединение через  $\alpha$ -1,2-гликозидную связь, тогда как для второй – через  $\alpha$ -1,3 [14, 22].

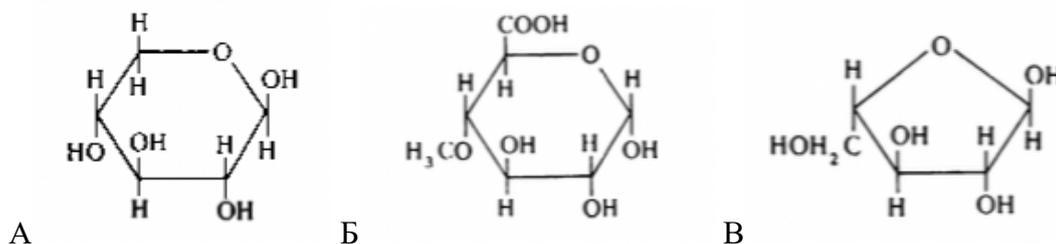


Рисунок 2. Основные моносахариды, входящие в структуру ксилана: А –  $\beta$ -D-ксилопираноза, Б – 4-О-метил- $\alpha$ -D-глюкуроновая кислота, В –  $\alpha$ -L-арабинофураноза.

*Арабиноглюкуроноксилан (арабиноксилан)* – полисахарид, имеющий разветвлённую структуру. В основной цепи присутствуют только  $\beta$ -1,4-D-ксилопиранозные звенья, а боковые образованы остатками L-арабинофуранозы и 4-О-метил-D-глюкуроновой кислоты (рис. 3). Данные группы встречаются довольно часто на протяжении всей цепи, что приводит к высокой вязкости арабиноксиланов. Арабиноксиланы встречаются в пшенице, ржи, ячмене, овсе, рисе [23].

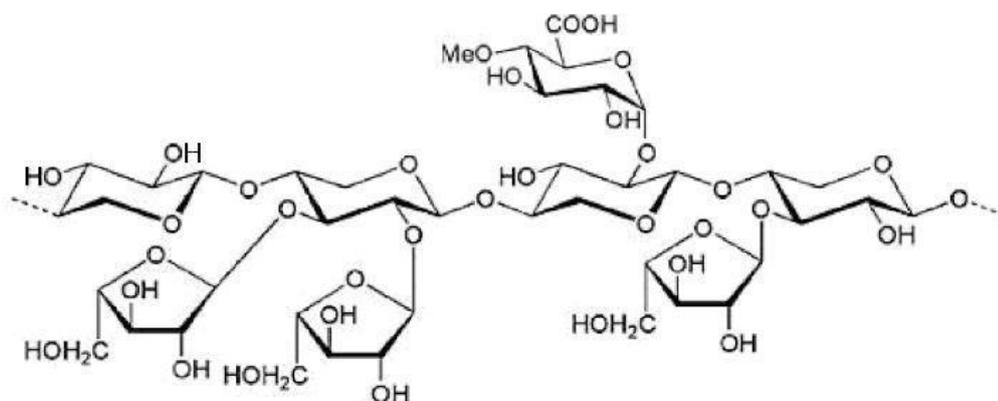


Рисунок 3. Структура арабиноглюкуроноксилана.

*Ацетилглюкуроноксилан (глюкуроноксилан)* – основной ксилан лиственных пород деревьев. Обладает разветвлённой структурой за счёт того, что 70% его ксилопиранозных звеньев ацетилировано по С2- и С3-углеродному атому. Каждое десятое звено соединено с 4-О-метил-D-глюкуроновой кислотой посредством  $\alpha$ -1,2-связи (рис. 4) [24].

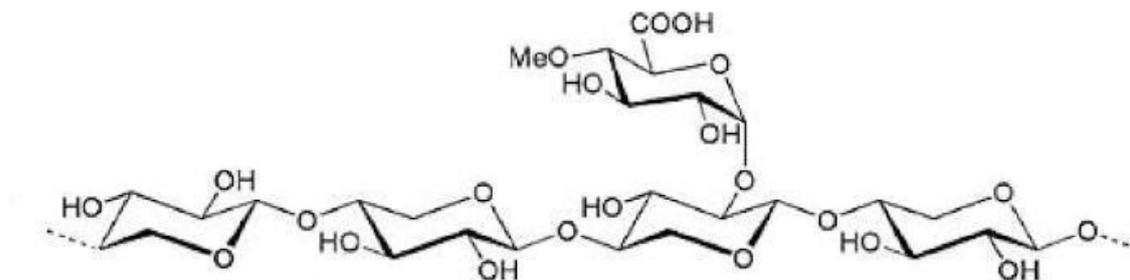


Рисунок 4. Структура глюкуроноксилана.

**Пектин** – полисахарид, образованный галактуроновой кислотой, связанной  $\beta$ -1,4-связью. Иногда в составе может встречаться её метиловый эфир. Имеет разветвлённую структуру. В клеточной стенке отвечает за транспорт ионов и водный обмен. Довольно много встречается в плодах растений [14].

**Лигнин** – нерегулярная макромолекула, образованная остатками фенилпропана. Получаемая трёхмерная структура не имеет единого типа связи между своими мономерами (рис. 5). Помимо этого, в структуре лигнина присутствуют 4-оксикоричный спирт и его производные (3-метокси-4-оксикоричный и 3,5-диметокси-4-оксикоричный спирты).

Такое нерегулярное строение объясняет его низкую реакционную способность, а аморфность всей молекулы позволяет ковалентно связываться с другими компонентами клеточной стенки, снижая в свою очередь и их реакционную способность [14].

Известно, что грибы белой гнили из *Ceriporiopsis subvermispora*, *Physisporinus rivulosus* и *Dichomitus squalens* способны расщеплять лигнин для лучшего доступа к полисахаридам клеточной стенки [25].

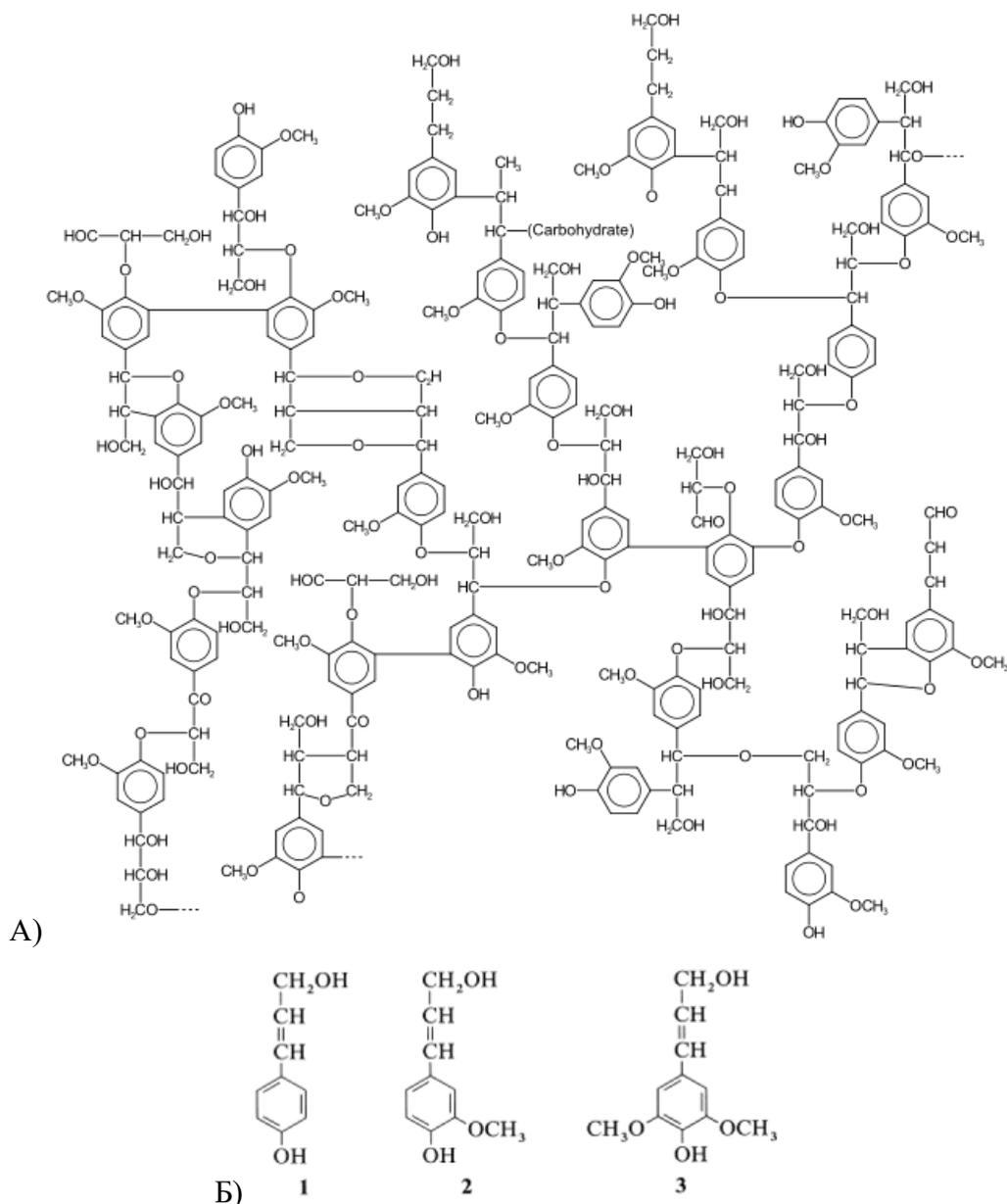


Рисунок 5. Структура лигнина (А) и строение основных его структурных компонентов (Б): 1 – 4-оксикоричный (п-кумаровый) спирт, 2 – 3-метокси-4-оксикоричный (кониферилловый) спирт, 3 – 3,5-диметокси-4-оксикоричный (синаповый) спирт.

### 1.3. Компонентный состав различных видов ЦСС

Состав ЦСС зависит от генотипа растений и конкретной ткани, в которой расположены клетки. Факторы окружающей среды также сказываются на количественном составе тех или иных компонентов в клеточной стенке. Например, для бытовых и промышленных отходов из-за множественного химического и физического воздействия характерно повышенное содержание целлюлозы и сниженное содержание прочих компонентов. Гемичеселлюлозы содержатся в больших количествах в траве, зелёных частях растений и коре. Лигнин в свою очередь в больших количествах встречается в соломе, древесной коре. Среди деревьев наибольшее количество целлюлозы наблюдается в хвойной древесине, а гемичеселлюлоз в них относительно немного. Для

лиственных пород деревьев в свою очередь характерно полное отсутствие смол, небольшое количество лигнина и большое содержание гемицеллюлоз [26]. В таблице 1 представлен состав различных видов ЦСС [7, 27-29].

Таблица 1. Содержание целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина в различных видах ЦСС в процентах от сухих веществ.

Источник ЦСС	Целлюлоза	Гемицеллюлоза	Лигнин
Отходы деревообработки			
Белая берёза	41	36	19
Тополь, осина	50–53	26–29	15–16
Сосна	42–43	18–25	29–30
Сельскохозяйственные отходы			
Пшеничная солома	33–50	24–36	9–17
Свекловичный жом	41	23	18
Багасса	32–44	27–32	19–24
Продукты и отходы ЦБК			
Целлюлоза лиственная белёная	85	11	0–3
Целлюлоза хвойная белёная	81	14–15	0–2
Газетная бумага	40–55	25–40	18–30

Древесина — это достаточно сложный продукт биологического происхождения, состоящий из клеток с прочными, одревеневшими оболочками. Она на 85–95% состоит из целлюлозы, гемицеллюлоз и лигнина и за счёт этого является сложной полимерной композицией. 90% этих веществ как раз и образуют клеточную стенку растений. В первом приближении древесину можно рассматривать как конструкцию из микроскопических слоистых армированных трубок – целлюлозных фибрилл, ориентированных в направлении ствола. Эти трубки внедрены в аморфную матрицу, состоящую из гемицеллюлоз и лигнина, которые связаны между собой ковалентными связями. Подобное строение негативно сказывается на возможности разделения и выделения компонентов системы в чистом виде. Для решения данной проблемы используются методы, основанные на разнице между растворимостью и химическими свойствами компонентов клеточной стенки [14].

Таким образом важным фактором при выборе сырья, которое подлежит переработке, является его состав. Наличие или отсутствие того или иного компонента может значительно влиять на ход процесса ферментативной деструкции.

#### 1.4. Предварительная обработка ЦСС

Из-за своей сложной многокомпонентной структуры ЦСС обладает низкой реакционной способностью (РС) и малоприспособлено для ферментативной деструкции [30, 31]. Основным мешающим компонентом является лигнин. В клеточной стенке он выступает в качестве физического барьера, препятствующего действию различных химических агентов. Так же на нём происходит непродуктивная адсорбция ферментов [32, 33].

Помимо этого целлюлоза, а точнее её кристаллическая часть, сама по себе устойчива к ферментативному гидролизу. Это связано с тем, что, находясь в жёстком, упорядоченном кристалле, цепи целлюлозы имеют довольно малую площадь поверхности, доступную для воздействия какими-либо агентами [34-36]. Способность гемицеллюлоз образовывать комплексы с остальными компонентами клеточной стенки также негативно сказывается на РС сырья [37-40].

Низкая РС является большим препятствием для биотехнологической переработки ЦСС. Решить данную проблему можно путём предварительной обработки сырья. Данный этап нацелен в первую очередь на разрушение структуры клеточной стенки и в последствии удаление лигнина из данной смеси. В процессе помимо извлечения лигнина может происходить разрушение структур микрофибрилл, а значит, и увеличение доступной поверхности для воздействия ферментов [41, 42].

Способы предобработки различаются по своим принципам воздействия на ЦСС. Можно выделить механические – нацеленные на силовые способы воздействия на сырьё, физические – использующие различные виды излучения и физические эффекты, связанные с ними, химические – воздействие агрессивными химическими агентами, физико-химические – воздействие химическими агентами в оптимальных условиях и биологические – использование живых организмов, от природы способных к воздействию на лигнин и другие мешающие компоненты клеточной стенки [43, 44].

##### *Механические методы*

Измельчение – метод, в котором разрушение ЦСС происходит в результате грубого физического воздействия, обычно трения, удара или сдвига. В результате образуются частицы малого размера, которые обладают улучшенной проницаемостью и сниженным ИК [45]. Это экологически дружелюбный метод предобработки, однако он требует высоких энергозатрат, тем больших, чем более глубокое измельчение субстрата необходимо. Данный метод может приводить к сильному нагреванию как самого субстрата, так и оборудования, так что для его реализации необходим интенсивный теплоотвод.

Экструзия подразумевает одновременное воздействие тепла, перемешивания и сдвигового воздействия на ЦСС. Она позволяет уменьшить ИК целлюлозы, избавиться от лигнина и

увеличить РС в несколько раз [46-48]. Однако в процессе могут образовываться побочные продукты, которые могут оказывать ингибирующее воздействие на ферменты и микроорганизмы [43].

#### *Физические методы*

Для предобработки ЦСС можно применять различного рода излучение, которое способно оказывать воздействие на структуру сырья. К таким методам относится обработка потоком  $\gamma$ -лучей [49] или электронов [50] (радиационные методы), использование микроволнового излучения [52], а также ультразвук [53].

Обработка жёстким излучением ( $\gamma$ -лучами в дозах 100–800 кГр и электронным излучением в дозах до 800 кГр) способно эффективно уменьшать ИК целлюлозы и других компонентов клеточной стенки и разупорядочивать их структуру [54–58]. Однако использование радиационных методов предобработки только разрушает лигнин, а не убирает его из системы.

Обработка микроволнами достаточно простой и низкзатратный метод предобработки ЦСС. Микроволны почти не приводят к образованию соединений, негативно влияющих на ферменты или микроорганизмы. Обычно используют частоты в пределах 300 МГц – 300 ГГц [59].

Обработка ультразвуком приводит к образованию кавитационных пузырьков, которые в свою очередь «взрывают» целлюлозу и гемицеллюлозу, повышая их доступность для воздействия ферментов [60, 61].

Физические методы требуют значительно меньше энергии, не требуют повышения температуры и их воздействие не приводит к образованию ингибиторов, однако их масштабирование затруднено, и сами по себе они не способны значительно увеличить РС сырья [43, 44, 62].

#### *Химические методы*

Использование водных растворов кислот приводит к расщеплению гликозидных связей лигноцеллюлозного матрикса и удалению лигнина и гемицеллюлоз [63-66]. Обычно используют разбавленные растворы кислот, поскольку они не требуют строгих мер безопасности и применения специального оборудования [67]. Кислотная предобработка проводится при температурах выше 100°C, однако повышение температуры до 180°C приводит к активному образованию фурановых соединений, которые являются токсичными для микроорганизмов, преобразующих моносахариды в этанол. Для предобработки используют различные минеральные ( $H_2SO_4$ ,  $HNO_3$ ,  $H_3PO_4$ ) и органические (уксусная, лимонная, щавелевая) кислоты.

Помимо кислот к химическим агентам, участвующим в предобработке, относятся растворы органолеп. Это органические или водно-органические растворители с добавлением

разного рода катализаторов. Процесс проводится при высокой температуре (100–250°C) [68, 69]. При их воздействии, как и при воздействии водными растворами кислот, удаляются лигнин и гемицеллюлозы.

Растворителями могут быть как спирты (метанол, этанол), так и другие органические соединения (простые эфиры и кетоны) [68, 70]. Для проведения предобработки можно ограничиться только ими, но в некоторых случаях требуется присутствие кислот (серной, соляной или уксусной) для более эффективной обработки. Эти кислоты и представляют собой катализаторы. Такая предобработка приводит к существенному увеличению РС целлюлозы. Но она имеет высокую стоимость и требует последующую регенерацию органических растворителей [71].

Воздействие щелочей (NaOH, KOH, NH<sub>4</sub>OH, Ca(OH)<sub>2</sub>) на ЦСС приводит к удалению только лигнина, почти не затрагивая гемицеллюлозы, к набуханию волокон целлюлозы, увеличению площади внутренней поверхности, что положительно влияет на эффективность ферментативного гидролиза [72-74]. Недостатком данного метода является огромная неэкологичность, связанная с получением растворов щелочей и лигнина. Для снижения их экологического вреда необходимо затратить дополнительные средства для нейтрализации или утилизации данных растворов.

Ионные жидкости (ИЖ) – жидкие при нормальных условиях органические соли, состоящие из органического катиона и аниона, который может быть как органическим, так и неорганическим. Они негорючи и почти не летучи, так что их можно рассматривать как “зелёные” растворители, которые наносят минимальный вред окружающей среде. Их воздействие на целлюлозу и другие полисахариды основывается на взаимодействии с гидроксильными группами и разрушении водородных связей. За счёт разрушения матрикса и микрофибрилл целлюлозы значительно увеличивается РС сырья, так как полисахариды становятся более растворимыми. Помимо этого, их можно легко осадить при добавлении воды или спирта. Обработка ИЖ не требует высоких температур, и в процессе не происходит синтез различных мешающих соединений, но сами ИЖ могут быть токсичными для ферментов и микроорганизмов на последующих стадиях переработки сырья [75]. Удаление ИЖ из растворов и их регенерация в свою очередь может быть достаточно трудоёмким процессом, требующим дополнительных затрат.

#### *Физико-химические методы*

Паровой взрыв является одним из наиболее часто используемых на практике методов [43]. ЦСС в течение короткого промежутка времени подвергаются воздействию насыщенного водяного пара при температурах 160–260°C и давлении 0,7–4,8 МПа. При этом происходит набухание

клеточной стенки растений и повышение доступности целлюлозы для ферментов [60]. В результате наблюдается заметное увеличение РС сырья. Данный метод не требует присутствия каких-то особенных химических реактивов и отличается низким энергопотреблением. Но данный процесс не приводит к полному удалению лигнина. Также он способствует образованию фурановых и ароматических соединений. Как говорилось выше, эти соединения негативно влияют на работу гидролитических ферментов и микроорганизмов, поэтому их присутствие в реакционной среде нежелательно [29, 76, 77]. Лиственные породы древесины и отходы сельского хозяйства в целом лучше поддаются данному виду предобработки, чем древесина хвойных пород деревьев, для которых паровой взрыв оказывается мало эффективен.

Вместо пара может использоваться вода. Данный метод называется гидротехническим. Горячая вода под высоким давлением вызывает гидролиз гемицеллюлоз и плавление лигнина с последующим образованием микрочастиц псевдолигнина. Целлюлоза сохраняет своё волокнистое состояние, но её доступность для ферментативного гидролиза увеличивается. Также в данном процессе не происходит образования ингибирующих фурановых соединений. Удаление образующегося в процессе псевдолигнина требует дополнительной стадии обработки, в которой обычно используют водно-щелочные растворы [78, 79].

Углекислотный взрыв – это использование сверхкритического CO<sub>2</sub> в качестве растворителя для экстракции лигнина и гемицеллюлоз из ЦСС [80, 81]. Поскольку данный процесс протекает при высоком давлении, то в результате происходит взрывная декомпрессия субстрата, которая приводит к разрушению структуры растительных волокон и создаёт большое число мест для атаки ферментами [82]. Данный метод не сопровождается образованием ингибиторов, но он не приводит к значительному увеличению РС целлюлозы в отличие от других физико-химических методов.

#### *Биологические методы*

Для биологической предобработки используют микроорганизмы, способные разлагать лигнин и гемицеллюлозу. Обычно используют грибы белой гнили (*Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Trametes versicolor* и др.), которые являются основными деструкторами лигнина в природе [83-85], а также некоторые бактерии [86]. Данный процесс занимает много времени (10–14 суток), требует строгого соблюдения условий роста грибов и занимает большие площади. Все эти факторы значительно ограничивают возможность промышленного применения данного метода [87].

## 2. Современные представления о механизме ферментативной деструкции растительной биомассы

Ферменты – эффективные биокатализаторы белкового происхождения, обладающие высокой специфичностью. Они способны во много раз ускорять химические реакции. Однако для расщепления сложных субстратов, таких как полисахариды, требуется протекание нескольких различных биохимических реакций. Такого эффекта можно добиться воздействием на субстрат комплекса ферментов, каждый из которых катализирует определённый биохимический процесс, что в совокупности обеспечивает полное расщепление полисахаридов до моносахаридов.

В природе ферментные комплексы, пригодные для деструкции ЦСС, встречаются у низших грибов. Продуцентами наиболее эффективных комплексов являются низшие грибы родов *Trichoderma* и *Penicillium* [88-90]. В составе их целлюлолитических комплексов содержатся в основном гидролитические ферменты. В результате воздействия этих ферментов на ЦСС образуются глюкоза и другие моно- и дисахариды.

### 2.1. Основные компоненты ферментного комплекса *Penicillium verruculosum*

Целлюлазный комплекс гриба *P.verruculosum* – сложная смесь, содержащая около 20 ферментов, в основе которой находятся гидролазы, способные преобразовывать целлюлозу в олигосахариды и глюкозу. На эффективность гидролиза целлюлозы и состав её продуктов после ферментативной деструкции влияют сбалансированность состава целлюлазного комплекса и уровни активности индивидуальных ферментов.

По важности участия в процессе биodeградации ферменты комплекса можно разделить на основные и вспомогательные. К основным относятся ферменты-деструкторы целлюлозы, которые участвуют в гидролизе целлюлозных волокон до целлоолигосахаров, чаще всего целлобиозы. В грибных целлюлазных комплексах эту роль выполняют два фермента: эндо-глюканаза (ЭГ) и целлобиогидролаза (ЦБГ). Вспомогательные ферменты в свою очередь не участвуют в гидролизе цепей целлюлозы, но их присутствие в комплексе оказывает положительный эффект на скорость и глубину гидролиза. В комплексах грибных ферментов к ним относятся  $\beta$ -глюкозидаза (БГЛ) (гидролизует целлобиозу и целлоолигосахара до глюкозы), полисахаридмонооксигеназа (ПМО) (окисляет  $\beta$ -1-4-гликозидную связь в кристаллической части целлюлозы) и ксиланазы (необходимы для гидролиза гемицеллюлоз) [91-96].

Грибные целлюлазы, как правило, проявляют максимум активности при pH 4,0–5,0, температурный оптимум находится в диапазоне 45–65°C. Естественно, также встречаются

нейтрально-щелочные (рН-оптимум 6,5–9,0) и кислые (рН-оптимум 2,5–3,0) целлюлазы [105-106].

В целлюлазах к каталитическому домену через линкер присоединён целлюлозосвязывающий модуль (ЦСМ). Адсорбция целлюлаз с помощью ЦСМ может приводить к диспергированию кристаллической целлюлозы и переводу её в более реакционноспособное состояние [97, 98].

Грибные целлюлазы гликозилированы. К белковой глобуле в процессе посттрансляционной модификации пришиваются олиосахариды, в некоторых случаях их содержание может достигать 40% от общей массы фермента [99, 100]. Мишенями для гликозилирования являются остатки серина и треонина линкерной части белка (О-гликозилирование) [101-104]. В каталитических доменах в свою очередь происходит N-гликозилирование через остатки аспарагина [105-109].

**Эндо-глюканызы (ЭГ)** – гликозил-гидролазы, действующие на внутренние связи полимерной молекулы, удаленные от её концов. Они наиболее эффективны при воздействии на растворимые субстраты, содержащие  $\beta$ -1,4-гликозидную связь – карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ) и  $\beta$ -глюкан. ЭГ проявляют высокую активность по отношению к аморфной целлюлозе, активность к кристаллической целлюлозе, наоборот, почти отсутствует [110, 111]. Для ЭГ характерно быстрое снижение вязкости полимерных субстратов [112, 113].

Активность грибных ЭГ по отношению к растворимым целлоолигосахаридам растёт с ростом степени полимеризации (СП) этих олигосахаров. Соответственно, они не способны гидролизовать целлобиозу, и большинство из них не оказывает воздействие на целлотриозу [114]. Конечным продуктом действия ЭГ являются эти два целлоолигосахарида. Активные центры ЭГ имеют вид «ущелья», в котором происходит связывание и гидролиз полимерной цепи целлюлозы или других  $\beta$ -глюканов.

ЭГ2 *P.verruculosum* (КФ 3.2.1.4, 40 кДа, Cel5A) относится к пятой семье гликозил-гидролаз. Она входит в состав ряда коммерческих и лабораторных ферментных препаратов. Сравнение её аминокислотной последовательности с последовательностями ЭГ из *Talaromyces emersonii*, *Aspergillus oryzae*, *A. kawachii* и *Thermoascus aurantiacus* (для которых получены кристаллографические структуры) показало, что для ЭГ2 консервативными каталитическими остатками являются остатки глутаминовой кислоты Glu142-Glu249 и расположенные рядом остатки, которые формируют пространственную структуру активного центра. Консервативный остаток Arg58 стабилизирует Glu249, а Tyr209, скорее всего, помогает активировать субстрат за счёт деформации глюкозидного кольца. Остатки His102, Asn141 и His207 связывают низкомолекулярные субстраты, а Trp183, Trp282, Trp287 и Trp288 связывают полисахаридные цепи за счёт «стекинг-взаимодействия» [115-120].

Большой интерес вызывает ЭГ1 *T.reesei* (КФ 3.2.1.4, 60 кДа, Cel7B) за счёт её способности гидролизовать кристаллические зоны целлюлозы [121]. Она способна гидролизовать не только растворимые формы целлюлозы, но и МКЦ. Этот фермент проявляет достаточно высокую активность к ксилоглюкану [122, 123], способен гидролизовать целлотриозу [122]. Каталитический домен ЭГ1 гомологичен каталитическому домену ЦБГ1. Гидролиз субстратов протекает с участием двух остатков глутаминовой кислоты, расположенных по разные стороны “расщелины”, по механизму двухстадийного замещения [124].

**Целлобиогидролазы (ЦБГ)** – гликозил-гидролазы экзо-действия, отщепляющие остатки целлобиозы от концов полимерных молекул целлюлозы и целлоолигосахаридов [125]. Они проявляют активность как к аморфным, так и к кристаллическим зонам целлюлозы. Скорость гидролиза полимерной цепи возрастает с ростом СП субстрата. Наличие высокой активности по отношению к кристаллической целлюлозе и воздействие на концы молекул целлюлозы по процессивному механизму (последовательная атака на молекулу полимерного субстрата без высвобождения субстрата), являются свойствами, которые позволяют отличить их от ЭГ [100, 126]. ЦБГ являются основными ферментами, ответственными за деструкцию целлюлозы.

ЦБГ имеет двухдоменную структуру. Один домен отвечает за катализ, а второй (ЦСМ) – за связывание с субстратом и продвижение по цепи целлюлозы. Эти домены соединены гибким линкером, представляющим собой неупорядоченные пептиды длиной от 6 до 100 аминокислотных остатков, который также может участвовать в дополнительном связывании субстрата [100]. Их структура оказывает большое влияние на активность ЦБГ [127, 128]. Встречаются варианты ЦБГ, состоящие только из каталитического домена – так называемые низкомолекулярные формы.

Сами каталитические домены имеют довольно крупные размеры, в них входит порядка 200-500 аминокислотных остатков. В отличие от ЭГ, активный центр ЦБГ имеет вид туннеля. Такое его строение объясняет, почему фермент может воздействовать только на концевые участки целлюлозы. В ходе гидролиза целлюлозы данный фермент функционирует по процессивному механизму (механизм множественной атаки). В рамках этого механизма после разрыва гликозидной связи вместо десорбции происходит протягивание молекулы субстрата через активный центр. В результате происходит последовательная серия гидролитических атак на одну и ту же молекулу целлюлозы с последовательным отщеплением остатков целлобиозы [129].

ЦБГ первого типа (ЦБГ1, КФ 3.2.1.176, 66 кДа, Cel7A) атакуют молекулу целлюлозы с восстанавливающего конца. Они способны расщеплять гетерозидную связь в различных хромогенных производных целлобиозы и лактозы (например, *n*-нитрофенильных), однако этот процесс протекает с невысокой скоростью [90, 130-133]. ЦБГ второго типа (ЦБГ2 КФ 3.2.1.91, 60

кДа, Cel6A) действуют с невосстанавливающего конца. Они также способны к гидролизу  $\beta$ -глюкана ячменя [90]. Степень процессивности ЦБГ1 выше, чем у ЦБГ2 за счёт того, что у первой активный центр длиннее и имеет большее количество субсайтов связывания глюкозидных остатков [125, 134-138].

Целлобиоза – основной продукт действия ЦБГ – также является сильным конкурентным ингибитором данного фермента [139]. В некоторых случаях в следовых количествах могут образовываться молекулы глюкозы, а также другие целлоолигосахариды [90, 140]. Специфика строения активного центра не позволяет ЦБГ гидролизовать КМЦ и другие полимерные субстраты с боковыми заместителями из-за стерических затруднений.

В структуре ЦБГ1 можно выделить несколько консервативных остатков, которые участвуют в катализе. Они были обнаружены путём выравнивания аминокислотной последовательности ЦБГ1 *P.verruculosum* и последовательностей ЦБГ из *P.funiculosum*, *A.fumigatus*, *A.niger* и *T.reesei*, для которых были определены кристаллические структуры. В последовательности ЦБГ1 *P.verruculosum* это остатки Glu209-Asp211-Glu214 и остаток Glu213, который, скорее всего, тоже участвует в процессе катализа. За «стекинг-взаимодействие» отвечают другие аминокислоты консервативного участка структуры – остатки триптофана Trp38, Trp 40, Trp 371 и Trp 380. За связывание с субстратом отвечают остатки тирозина Tyr51, Tyr82, Tyr 374 и Tyr385. Стоит отметить, что вместо остатка Tyr374 в структуре ЦБГ1 *A.fumigatus* расположен остаток гистидина [132, 141-144].

Для ЦБГ2 *P.verruculosum* также проводили сравнение с последовательностями ферментов из *T.reesei* (есть экспериментально полученная кристаллографическая структура), *Tal. cellulolyticus*, *P.brasilianum*, *A.niger*, *A.kawachii* и *T. harzianum*. Консервативными каталитическими остатками в последовательности ЦБГ2 *P.verruculosum* являются остатки аспарагиновой кислоты Asp165-Asp211-Asp391 и ближайшие остатки, участвующие в формировании трёхмерной структуры активного центра. В «стекинг-взаимодействии» задействованы ароматические остатки триптофана Trp123, Trp259 и Trp357. Остаток Trp262 направляет полисахаридную цепь в тоннель активного центра, за водородные связи отвечают остатки Tyr 159 и Thr218. За связывание с активным центром отвечают консервативные остатки Asn215, Tyr91, Trp354 и His404 [133, 145-147].

**$\beta$ -глюкозидазы (БГЛ) или целлобиазы** – ферменты, отвечающие за расщепление целлобиозы и целлоолигосахаридов до глюкозы – конечного продукта гидролиза целлюлозы. Они атакуют субстрат с невосстанавливающего конца. Скорость гидролиза уменьшается с увеличением числа глюкозидных остатков в цепи олигосахаридов. БГЛ способна к гидролизу не только  $\beta$ -1,4-, но и других типов связи ( $\beta$ -1,2-,  $\beta$ -1,3-,  $\beta$ -1,6-глюкозидных связей), хотя скорость

гидролиза этих связей меньше, чем  $\beta$ -1,4 [148]. Также БГЛ способна к отщеплению заместителей от молекулы глюкозы, например в *n*-НФ- $\beta$ -D-глюкозиде.

Как правило БГЛ состоит из нескольких субъединиц, размер которых варьируется от 41 до 170 кДа. Эти субъединицы объединяются в более крупные структуры, которые могут состоять как из двух субъединиц, так и из большего их числа. Активный центр большинства БГЛ имеет вид кратера [100]. В отличие от остальных ферментов целлюлазного комплекса эти ферменты могут быть не только внеклеточными, но и мембранными и внутриклеточными [149, 150]. Способность БГЛ гидролизовать короткие олигосахариды является принципиально важным для протекания процесса ферментативного гидролиза. Помимо получения глюкозы – конечного продукта деструкции целлюлозы – этот фермент уменьшает содержание в реакционной смеси целлобиозы и тем самым снимает ингибирование с ЭГ и ЦБГ (глюкоза ингибирует эти ферменты в значительно меньшей степени [9]). Из-за того, что БГЛ не гидролизуют сами волокна целлюлозы, они относятся к вспомогательным ферментам целлюлазного комплекса.

Особенностью БГЛ *P.verruculosum* является то, что она хорошо адсорбируется на МКЦ и других нерастворимых субстратах, тем самым снижается ее концентрация в растворе, поэтому во многих случаях для осахаривания целлюлозы используется БГЛ *A.niger* (КФ 3.2.1.21, 99 кДа, Cel3A), не адсорбирующаяся на целлюлозе [95, 96].

**Полисахаридмонооксигеназы (ПМО)** – группа медь-зависимых монооксигеназ, способных к окислительной деструкции природных полисахаридов, в том числе кристаллической целлюлозы (КФ 1.14.99.53-56, AA9) [9, 151]. Данный фермент не является гидролазой, но формально относится к целлюлазам из-за своего влияния на гидролиз целлюлозы. Активный центр данных ферментов представляет собой плоскость 30x40 Å, на поверхности которой расположены аминокислоты, отвечающие за координацию и связывание субстрата, а в центре находится ион меди, координируемый двумя остатками гистидина. Для протекания реакции необходимо присутствие кислорода или перекиси водорода и донора электронов (аскорбиновой кислоты или продуктов биodeградации лигнина) [152].

Для данных ферментов характерно явление региоселективности. Некоторые из них способны окислять только одно конкретное положение в глюкозидном остатке. Так, ПМО первого типа способны атаковать только C1-атом глюкозидного остатка, образуя при этом альдоновую кислоту на месте восстанавливающего конца молекулы целлюлозы. ПМО второго типа окисляют C4-атом, и в результате их воздействия на невосстанавливаемом конце образуется гемидол. Третий тип в свою очередь способен к воздействию как на C1-, так и на C4-атом с образованием соответствующих продуктов (рис. 6) [153].

Важно то, что ПМО окисляет и разрывает цепь целлюлозы в произвольном месте, чаще всего в кристаллической зоне целлюлозы. Образовавшиеся свободные концы молекул могут

выступать местом атаки ЦБГ. Появление же заряженных групп на концах цепей приводит к аморфизации структуры целлюлозы и повышению её доступности для других ферментов [154-157]. ПМО являются вспомогательными ферментами, их включают в состав целлюлазного комплекса из-за их роли в процессе ферментативного гидролиза целлюлозы.

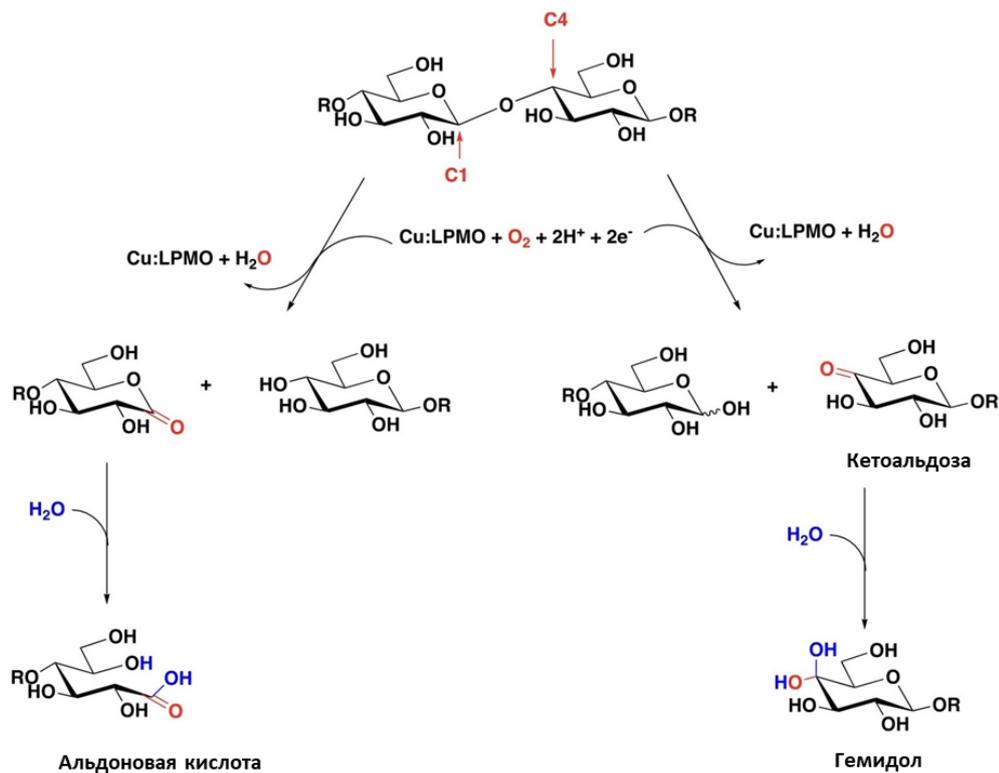


Рисунок 6. Механизм действия ПМО в зависимости от региоселективности фермента.

В ферментном комплексе, секретируемом грибами, могут содержаться и другие ферменты, которые участвуют в гидролизе нецеллюлозных компонентов клеточной стенки, например гемицеллюлоз или пектинов. Для их расщепления необходимо наличие таких ферментов как β-глюканазы, маннаназы, ксиланазы, ксилоглюканазы и пектиназы. Хотя эти ферменты и не влияют на целлюлозу, они способны увеличить выход глюкозы косвенно, за счёт гидролиза нецеллюлозных полисахаридов и увеличения эффективности действия целлюлаз. Часто используют фермент эндоксиланазу (например, КсилЕ из *P. canescens*, КФ 3.2.1.8, 40 кДа, Cel10) для ликвидации гемицеллюлозного матрикса вокруг микрофибрилл целлюлозы и переработки его в растворимые ксилоолигосахариды [90].

## 2.2. Механизм ферментативной деструкции целлюлозы

Клеточная стенка растений представляет собой довольно сложную многокомпонентную систему, и проведение предобработки ЦСС не гарантирует полного удаления нецеллюлозных

компонентов. Сама целлюлоза также является довольно инертным объектом. Содержание кристаллических зон упаковки глюкозидных звеньев в ней значительно превышает содержание зон аморфности вне зависимости от вида сырья. По этой причине для эффективного гидролиза целлюлозы необходимо совместное действие различных по свойствам ферментов.

Ферменты, участвующие в процессе деструкции целлюлозы, были описаны выше. Кристаллические зоны целлюлозы окисляются ПМО, аморфные в свою очередь гидролизуются ЭГ с образованием растворимых олигосахаридов. В результате увеличивается число свободных концевых групп – субстрата для действия ЦБГ. Они последовательно отщепляют остатки целлобиозы в кристаллической или аморфной зоне субстрата с восстанавливающего (ЦБГ1) и невосстанавливающего конца (ЦБГ2). Растворимые олигосахариды и целлобиоза, образующиеся под действием ЭГ и ЦБГ, гидролизуются до глюкозы под действием БГЛ (рис. 7) [158].

Для ферментов целлюлазного комплекса характерно явление синергизма. Синергетический эффект проявляется в том, что ПМО и ЭГ увеличивают количество зон, с которыми может связаться ЦБГ; кроме того, и ЦБГ, и ЭГ создают субстрат для БГЛ, а сама БГЛ минимизирует ингибирование ЦБГ целлобиозой и обеспечивает получение конечного продукта – глюкозы [159]. Было установлено, что для эффективного снятия эффекта ингибирования целлобиозой в реакционной смеси достаточно присутствие 10% БГЛ [160].

Только наличия этих ферментов в реакционной смеси недостаточно для эффективного и глубокого гидролиза ЦСС. Важную роль играют и оптимальное соотношение ферментов в реакционной смеси, и свойства индивидуальных ферментов: каталитические (высокая специфическая активность), физико-химические (рН- и температурный оптимумы), эксплуатационные (стабильность, устойчивость к воздействию ингибиторов и агрессивных агентов).

Состав целлюлазных комплексов и свойства ферментов в нём сильно зависят от организма-продуцента. К сожалению, лишь малое количество изученных природных ферментных комплексов подходят для эффективного и глубокого гидролиза целлюлозы – в первую очередь это связано с несбалансированным составом компонентов внутри комплекса. Неоптимальный состав не позволяет достигнуть максимального выхода глюкозы. Можно пытаться использовать одновременно несколько комплексов, обладающих высокими активностями каких-то отдельных ферментов. Второй путь — это модификация и оптимизация имеющихся неоптимальных комплексов под конкретные нужды и задачи [161].

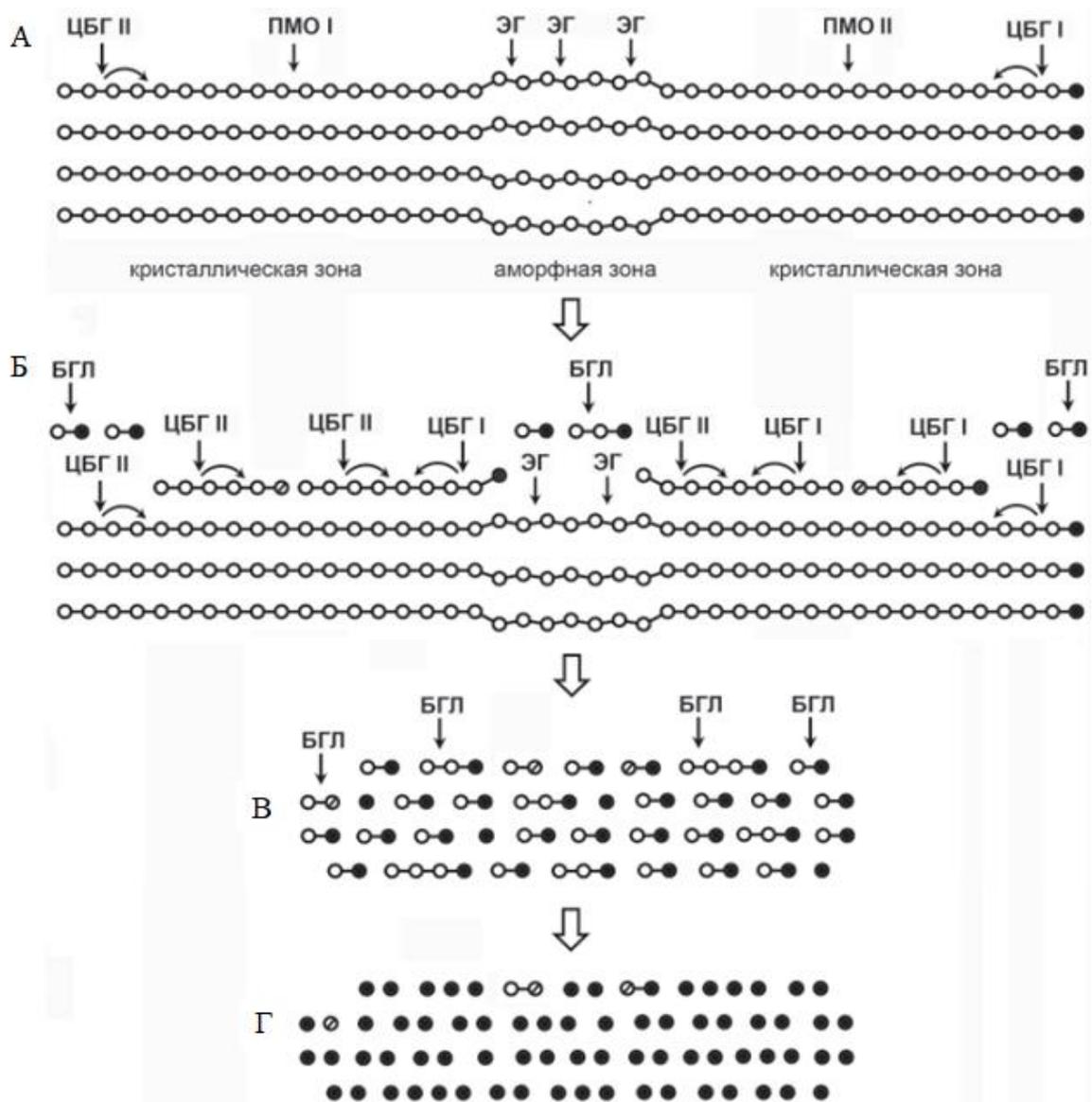


Рисунок 7. Механизм синергетического действия целлюлазного комплекса плесневых грибов на целлюлозу. А – исходная целлюлоза. Б – целлюлоза после первого этапа гидролиза с образовавшимися свободными концами. В – смесь целлобиозы, целлоолигосахаров и глюкозы. Г – раствор глюкозы, в котором присутствует малое количество целлобионовой и глюконовой кислот. Чёрными кружочками обозначены глюкоза и восстанавливающие концы, белыми – ангидроглюкозные остатки, перечёркнутыми – глюконовая кислота и окисленные концы олигосахаридов [9].

### 3. Методы увеличения эффективности процесса биodeградации целлюлозы

Одним из главных препятствий для практической реализации процесса ферментативной биodeградации ЦСС является низкая эффективность гидролиза при высокой стоимости самих ферментов. Это приводит к высокой стоимости конечных продуктов, которые могут быть получены из технических сахаров: биоэтанола, биопластиков, органических спиртов и кислот, углеводов и углеводородов – и их неконкурентоспособности [162].

В качестве мер для снижения стоимости ферментов и процесса биodeградации ЦСС предлагается несколько взаимодополняемых подходов. Помимо описанной выше стадии предобработки ЦСС, применяют подходы, нацеленные на улучшение и оптимизацию условий проведения ферментативного гидролиза, оптимизацию состава ферментных препаратов (ФП) под конкретное сырьё и снижение расхода и стоимости ФП. Основные используемые подходы перечислены в таблице 2 [10, 163, 164].

#### 3.1. Анализ основных методов увеличения эффективности гидролиза

Улучшения свойств ФП можно добиться с помощью поиска новых ферментов с увеличенной активностью или уникальной субстратной специфичностью [36, 165-167].

##### *Оптимизация состава ферментного комплекса*

Как уже упоминалось, для эффективного протекания процесса ферментативного гидролиза состав ферментных комплексов должен быть адаптирован под конкретный вид ЦСС и конкретный способ его предобработки. Для этого сначала проводят оптимизацию состава, подбирая качественно и количественно индивидуальные, очищенные ферменты, входящие в состав комплекса, учитывая синергетический эффект, которые они оказывают друг на друга. Конкретный вид ЦСС подвергают гидролизу различными смесями ферментов и на основании их сравнения и проводят подбор оптимальных смесей. Например, для деструкции МКЦ оптимальный состав ферментов выглядит следующим образом: ЦБГ1 36–41 %, ЦБГ2 16–20%, ЭГ2 12–18 %, ПМО 1-24% (ферменты *P.verruculosum*), БГЛ *A.niger* 5–11% [168].

После определения оптимального соотношения ферментов далее с помощью ДНК-технологий рекомбинантных штаммов-продуцентов и их скрининга создаются ФП с необходимым составом и соотношением ферментов для переработки ЦСС [168-172].

Таблица 2. Основные методы увеличения эффективности ферментативного гидролиза в процессах биотехнологической переработки ЦСС.

Принцип	Методы	Результат
Предобработка	Проведение биологической, механической, физической или химической предобработки	Увеличение реакционной способности сырья
Оптимизация состава ферментного комплекса	Оптимизация компонентного состава ферментного комплекса с использованием индивидуальных ферментов с учётом синергетического взаимодействия. Выбор ферментов для определённого вида ЦСС.	Снижение расхода ферментов
Конструирование штаммов-продуцентов ферментов	Увеличение продуктивности штаммов. Оптимизация условий культивирования. Поиск новых штаммов-продуцентов. Конструирование рекомбинантных штаммов, позволяющих получать ферментные комплексы с заданным составом.	Снижение стоимости ферментов
Оптимизация условий ферментативного гидролиза	Снижение дозировки ферментов, повторное использование ферментов, уменьшение длительности процесса. Изменение параметров реакционной среды (Т, концентрация субстрата, рН, ионная сила раствора, наличие и способ перемешивания). Снижение ингибирования продуктами гидролиза.	Увеличение выхода сахаров
Снижение уровня ингибирования ферментов	Достижение максимального превращения целлю- и ксило-олигосахаридов в моносахариды для уменьшения степени ингибирования ферментов. Превращение сахаров в другие продукты (этанол) за счёт совмещения процессов гидролиза и ферментации.	Увеличение степени конверсии сырья
Улучшение свойств ферментов	Белковая инженерия ферментов для увеличения молекулярной активности и операционной стабильности, для уменьшения чувствительности к ингибированию сахарами и лигнином.	Увеличение активности и стабильности ферментов
Снижение расхода ферментов	Иммобилизация. Увеличение операционной стабильности ферментов.	Снижение расхода ферментов

#### *Оптимизация условий ферментативного гидролиза*

Оптимизация условий гидролиза в первую очередь нацелена на выбор таких условий, которые приводят к максимальной эффективности процесса биодegradации ЦСС. Правильно подобранные параметры реакционной среды (рН, температура, ионная сила, скорость перемешивания, концентрация реагентов) способны значительно увеличить эффективность всего процесса гидролиза и повысить глубину конверсии и выход сахаров. Эти параметры влияют на активность и стабильность ферментов, а также на временную протяжённость процесса деструкции. Для этого необходимо знать каталитические и физико-химические свойства ферментов [162, 173].

Ещё одним способом увеличения выхода целевых сахаров и проведения глубокой деструкции ЦСС является снижение влияния ингибиторов. К сожалению, все ферменты

целлюлазного комплекса грибов в той или иной мере подвержены ингибирующему влиянию со стороны глюкозы, целлобиозы или целлоолигосахаров – продуктов гидролиза, накапливающихся в реакционной среде.

Снижения эффекта ингибирования ферментов можно добиться расщеплением целлоолигосахаров и целлобиозы до глюкозы – моносахарида, оказывающего наименьший ингибирующий эффект. Можно удалять продукты гидролиза с помощью проведения одновременного параллельного процесса микробиологической трансформации сахаров в спирты или другой целевой продукт или с помощью их селективного выделения из реакционной смеси. Совмещение процесса гидролиза и микробиологической трансформации позволяет уменьшить общее время биокаталитической трансформации ЦСС [174, 175]. Ингибирующие эффекты веществ, образующихся при трансформации сахаров (спирты и органические кислоты), чрезвычайно малы [176, 177].

#### *Улучшение свойств ферментов*

Комплексные ФП содержат ферменты, обладающие различными рН- и температурными оптимумами, которые могут отличаться от необходимых условий протекания гидролиза. Их эксплуатационные характеристики (операционная стабильность, устойчивость к солям, чувствительность к ингибирующим веществам) также могут не соответствовать технологическим требованиям протекания процесса биодеградации ЦСС.

Для изменения свойств отдельных ферментов под технологические нужды применяются методы белковой инженерии. Они позволяют скорректировать свойства ферментов так, чтобы они проявляли максимум активности в заданных условиях проведения процесса [178, 179]. Методами белковой инженерии можно добиться существенного увеличения активности и операционной стабильности. Основными используемыми подходами белковой инженерии ферментов являются рациональный дизайн и направленная эволюция [180-182].

Метод рационального дизайна основан на прогнозировании и осуществлении точечных, заранее предсказанных, аминокислотных замен. Для его применения необходимо знание точной аминокислотной последовательности, пространственного строения белка и всех функциональных аминокислот. Данные о пространственной структуре белка и ключевых аминокислотах можно получить, анализируя кристаллографические данные структуры белка или используя выравнивание аминокислотной последовательности исследуемого белка и уже известных родственных белков [180, 183]. Так, например, данный метод использовали для изменения рН-оптимума ЭГ1-237 из *Bacillus subtilis* с 9 до 9,6-10 [184], увеличения термостабильности и сдвигу температурного оптимума ЦБГ *T.reesei* на 5,6°C при замене всего

одного аминокислотного остатка [185]. Данный метод хорошо подходит для изучения механизма ферментативного катализа и определения роли различных аминокислотных остатков.

Метод направленной эволюции не требует знания аминокислотной последовательности и структуры белка. Суть этого метода заключается во внесении множества случайных аминокислотных замен в ожидании получения мутантных форм с улучшенными свойствами. При этом требуется провести скрининг множества (порядка десятков тысяч) мутантных форм фермента, чтобы найти белок с положительной мутацией [186]. С помощью этого метода удалось добиться увеличения каталитической активности ЭГ2 *B.subtilis* в 5 раз [187]. Этот метод удобен, когда есть простой и быстрый способ определения требуемой активности и есть возможность автоматизировать скрининг.

Так же существует метод, основанный на совмещении двух предыдущих – направленная эволюция рационально выбранного участка аминокислотной цепи. Он объединяет преимущества обоих методов. Благодаря компьютерному моделированию в рамках направленной эволюции получается просчитать и получить наиболее вероятные мутантные формы, обладающие необходимыми свойствами, а также значительно уменьшить количество форм, которые нужно подвергать скринингу [182, 188].

При использовании белковой инженерии для улучшения свойств ферментов вносятся модификации как в активный центр, так и на поверхность белковой глобулы, так как там находятся аминокислоты, отвечающие за связывание с субстратом. Белковые петли также выступают в качестве цели для аминокислотной замены, так как их модификация в тех же ЦБГ может приводить к увеличению процессивности данных ферментов [127, 189]. Замена аминокислот, находящихся внутри глобулы, может приводить к увеличению жёсткости всей структуры за счёт появления новых внутримолекулярных связей (дисульфидных мостиков, гидрофобных ядер, водородных связей и т.д.), что положительно сказывается на термостабильности ферментов [180, 190, 191].

### **3.2. Рациональный дизайн грибных целлюлаз**

Для использования метода рационального дизайна необходимо знание аминокислотной последовательности ферментов, в которых проводится модификация, их механизма действия и пространственной структуры. Для ЭГ и БГЛ при рациональном дизайне в основном модифицируют участки внутри глобулы (активный центр или а/к, участвующие во внутренних нековалентных взаимодействиях) [192, 193], тогда как в случае ЦБГ целью рационального дизайна выступает ещё и поверхность глобулы [184]. Это связано с тем, что свойства поверхности глобулы ЦБГ коррелируют с эффективностью адсорбции на нерастворимых субстратах, что влияет уже на каталитические свойства, а ЭГ и БГЛ более активны к

растворимым субстратам. Так же было установлено, что петли вокруг активного центра ЦБГ имеют большую роль в процессивности данного фермента [189].

Большинство грибных целлюлаз по своей структуре являются гликопротеинами. Помимо аминокислотных остатков в их структуре присутствуют олигосахариды, ковалентно связанные с ними через  $\beta$ -амидную группу остатков аспарагина (N-гликозилирование) или через  $\beta$ -гидроксильные группы остатков серина и треонина (O-гликозилирование) [194]. N-гликозилирование обычно происходит в каталитическом домене фермента. На его поверхности может находиться несколько сайтов N-гликозилирования. Сахара, участвующие в данном типе гликозилирования, обычно имеют разветвлённую структуру и состоят из нескольких десятков моносахаридных остатков. O-Гликозилирование затрагивает строго линкер фермента, который богат остатками треонина и серина. Одновременно в нём может быть порядка 10 и более сайтов гликозилирования, так что линкер оказывается “покрыт” сахарами, что защищает его от воздействия протеаз и увеличивает общую стабильность целлюлаз. O-Связанные гликаны – это обычно один или несколько моносахаридных остатков [184, 194].

Структура и количество гликанов на поверхности глобулы сильно зависит от организма-продуцента, который синтезирует конкретный белок. Процессы гликозилирования можно разделить на два этапа. Первый – это посттрансляционная модификация в эндоплазматическом ретикулуме, где как раз и происходит шивка остатка аминокислоты и гликана. Данный процесс протекает одинаково во всех эукариотических клетках [195]. На втором этапе происходит модификация пришитых гликанов в аппарате Гольджи, и этот шаг сильно зависит от того, в каком конкретно организме продуцируется белок [196].

Гликозилирование играет важную роль в формировании, секреции и проявлении каталитических и биохимических свойств ферментов. Гликаны на поверхности белковой глобулы нужны для её стабилизации [197], правильного фолдинга, секреции и распознавания фермента внутри клетки [194]. На примере БГЛ *A.terreus* было показано уменьшение экспрессии при модификации сайтов N-гликозилирования, при этом синтез мРНК оставался на прежнем уровне. Уменьшение секреции было связано с тем, что модифицированная БГЛ разрушалась в клетке до этапа ее секреции во внеклеточное пространство.

В целом дегликозилированные ферменты могут оказаться менее стабильными и активными, и, помимо этого, модифицированные ферменты могут проявлять меньшую стабильность в процессе их выделения и очистки по сравнению с исходным ферментом, в котором не проводилось удаление сайта гликозилирования [197].

Однако это верно не для всех ферментов. Эндоглюканазы и целлобиогидралазы гриба *Cellulomonas fimi* были экспрессированы с помощью гетерологичной системы *Escherichia coli*. Отсутствие гликозилирования никак не влияло на синтез и секрецию каталитически активных

форм этих ферментов. Для них наблюдалось полное сохранение биохимических и каталитических свойств, но все они оказались менее устойчивы к действию протеаз из-за отсутствия процесса гликозилирования в ходе посттрансляционной модификации [102].

Гликозилирование крайне важно для эффективной и глубокой переработки ЦСС. Гликопротеины проявляют большую операционную стабильность и устойчивость к агрегации. Присутствие олигосахаридов на поверхности глобулы также хорошо сказывается на растворимости целлюлаз и стабильности элементов вторичной структуры даже в растворах с высокой ионной силой [194, 198, 199].

В дальнейшем мы будем рассматривать именно N-гликозилирование, так как гликаны, связывающиеся с белковой глобулой, способны оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на связывание фермента с субстратом. Они также способны влиять на каталитическую активность целлюлаз, фолдинг ферментов и стабилизацию белковой глобулы. O-Гликозилирование оказывает влияние только на стабильность белковой глобулы [194, 197, 200]. Сахара, участвующие в N-гликозилировании, характеризуются высоким содержанием маннозы. Для ЦБГ, секретируемых грибами родов *Aspergillus* и *Trichoderma*, состав гликанов описывается формулой  $(\text{Man})_x(\text{GlcNAc})_2$ , где  $x=5-20$  [105, 107, 194, 201, 202]. У ЭГ гриба *T.reesei* количество остатков маннозы находится в диапазоне от 3 до 5, а иногда в качестве гликоолигосахарида выступает остаток GlcNAc [105]. Так же гликаны целлюлаз из *T.reesei* и *A.oryzae* могут быть фосфорилированы [203, 204].

На примере гетерологичной экспрессии ЭГ *T.reesei* в *A.niger* наблюдалось возрастание адсорбционной способности и уменьшение каталитической активности к МКЦ и аморфной целлюлозе. Такой эффект проявлялся за счёт того, что степень N-гликозилирования данного фермента возрастала в шесть раз относительно нативной формы [128, 194].

В случае ЭГ *T.emersonii* при клонировании её в *Saccharomyces cerevisiae* вместе с увеличением степени N-гликозилирования наблюдалось увеличение активности к МКЦ и рост термостабильности [205]. Это говорит о том, что гликозилирование способно определять активность ферментов к нерастворимым субстратам за счёт уменьшения адсорбционной способности.

Модификация сайтов гликозилирования ЦБГ также влияла на эффективность работы ферментов. В случае ЦБГ *T.reesei* удаление сайта гликозилирования напротив активного центра приводило к увеличению активности на 70% относительно нативной формы. Замена подобного сайта у ЦБГ *P.funiculosum* позволило повысить каталитическую активность на 30%. Создание же дополнительного сайта гликозилирования приводило к повышению активности на 70%. Что важно, внесение мутаций, направленных на дегликозилирование, помимо увеличения активности снижало термостабильность ферментов [206].

### 3.3. Свойства дегликозилированных форм ЦБГ1д и ЭГ2д *P.verruculosum*

ЦБГ1 *P.verruculosum* имеет на своей поверхности несколько сайтов N-гликозилирования: N45, N194, N388, N430 (рис. 8). Все эти сайты расположены на поверхности белковой глобулы в областях, потенциально важных для катализа. Сайт N45 находится прямо перед входом в туннель активного центра, N194 и N388 расположены на поверхности петель, которые ограничивают тоннель активного центра, а N430 – рядом с началом линкера, соединяющего каталитический и целлюлозосвязывающий домены вместе. Для каждого из сайтов гликозилирования была проведена точечная замена соответствующего аспарагина на аланин, получены трансформанты на основе гриба *P.canescens*, проведены ферментации и скрининг полученных препаратов. Из выбранных препаратов были выделены индивидуальные рекомбинантные мутантные белки и проведено сравнение биохимических, физико-химических и каталитических свойств всех полученных форм с нативной [207, 208].

Фермент с заменой N430A не обнаруживался ни в культуральных жидкостях (КЖ), ни в грибных клетках. Скорее всего данный сайт влиял на фолдинг белка или его пост-трансляционную модификацию, и без гликана в данном положении происходило разрушение фермента. Ферменты с заменами N45A, N194A и N388A секретиrowались без каких-либо проблем.

Физико-химические свойства (термостабильность, температурный и pH-оптимум) для всех полученных форм остались неизменными. Значение pI формы с заменой N45A совпадало со значением pI нативной формы и составляло 4,3, для форм N194A и N388A изоэлектрическая точка сдвинулась к значениям pI 3,8 и 3,9 соответственно.

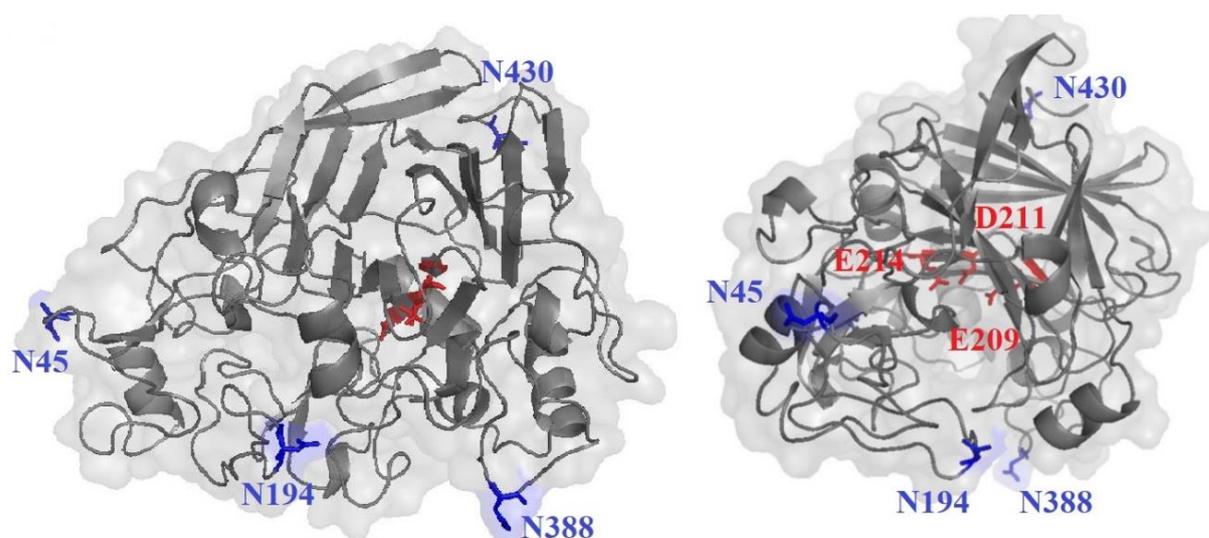


Рисунок 8. Теоретическая трёхмерная модель каталитического домена ЦБГ1 *P.verruculosum*. Красный – остатки E209-D211-E214, синий – остатки аспарагина N45, N194, N388 и N430, входящие в состав теоретических сайтов N-гликозилирования.

Степень адсорбции на МКЦ формы N45A совпадала со степенью адсорбции нативной немутантной формы и составляла 88%. Степень адсорбции мутантов N194A и N388A составила 78%, что свидетельствовало о том, что гликаны, связывающиеся с данными сайтами гликозилирования, участвуют в процессе адсорбции.

Сравнение активностей к различным субстратам (МКЦ, *n*-НФ- $\beta$ -лактозиду и  $\beta$ -глюкану) и гидролитической способности (по отношению к МКЦ и осиновой древесине) показали преимущество мутантной формы N45A по сравнению с нативной и другими мутантными формами. Активность данной формы увеличилась на 10, 35 и 150% в зависимости от субстрата, а выход глюкозы по сравнению с нативной формой увеличился на 50% за 48 ч гидролиза МКЦ и на 60% при гидролизе осиновой древесины при концентрации фермента 0,1 мг/мл. Для остальных мутантных форм наблюдалось снижение и активности, и гидролитической способности [209].

ЭГ2 *P.verruculosum* имеет три теоретических сайта гликозилирования. Один из них, N19, находится в консервативной области аминокислотной последовательности и расположен внутри белковой глобулы около участвующего в катализе остатка R58. Ещё два сайта гликозилирования N42 и N194 расположены на поверхности белковой глобулы и легко могут быть подвержены процессу N-гликозилирования (рис. 9). Как и в случае с ЦБГ1, были проведены соответствующие замены и выполнены те же этапы отбора и получения мутантных и нативной форм; для культивирования также использовался гриб *P.canescens* [207].

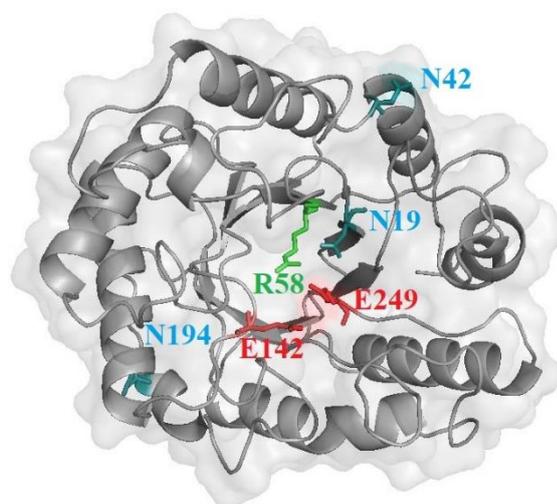


Рисунок 9. Теоретическая трёхмерная модель каталитического домена ЭГ2 *P.verruculosum*. Красным цветом показаны каталитически активные остатки E142 и E249, зеленым – остаток R58, синим – остатки N19, N42 и N194, входящие в состав теоретических сайтов N-гликозилирования.

Уровень секреции всех мутантных форм совпадал с уровнем секреции нативного фермента. Это значит, что ни один из гликанов ЭГ2 не участвует в фолдинге белка. Сравнение рН-профиля показало, что все формы обладали схожей формой, но для нативной формы и мутанта N19A оптимум активности составил 4,5, тогда как для мутантных форм N42A и N194A

– 5,0. Замена сайтов гликозилирования не повлияла на термостабильность и температурный оптимум активности – для всех форм они были одинаковы. Степень адсорбции всех форм была меньше 10%.

Сравнение активностей к КМЦ и  $\beta$ -глюкану показало, что формы N42A и N194A обладали повышенной каталитической активностью по отношению к данным субстратам в сравнении с нативной формой (на 10–35% в зависимости от субстрата), тогда как форма N19A обладала меньшей активностью. Это может быть связано с изменением конфигурации активного центра. Гидролиз осинового дерева также показал преимущество форм N42A и N194A над нативной и формой N19A. Для них наблюдалось увеличение выхода глюкозы на 10 и 25% соответственно за 24 ч гидролиза, тогда как для формы N19A наблюдалось снижение выхода на 10% по сравнению с нативной формой [208].

Таким образом мутантные формы ЦБГ1 N45A и ЭГ2 N194A проявляли большую гидролитическую активность в сравнении с нативными.

\*\*\*

На основании анализа литературы в данной работе была поставлена цель: оптимизация состава комплекса гриба *P. verruculosum* и улучшение свойств его основных целлюлаз методами белковой инженерии для получения препарата с высокой осаживающей способностью. Для выполнения этой цели нужно решить следующие задачи:

- Получить ферментные препараты (ФП), содержащие мутантные формы ЦБГ1д и ЭГ2д с увеличенной удельной активностью. Выделить в индивидуальном виде мутантные формы.
- Провести сравнительное изучение гидролитической способности индивидуальных мутантных и нативных форм ЦБГ1 и ЭГ2, а также других основных ферментов целлюлазного комплекса (ЦБГ2 *P. verruculosum* и ЭГ1 *T. reesei*).
- Изучить наличие и возможность синергетического взаимодействия между целлюлолитическими ферментами различной специфичности и определить наиболее активные смеси индивидуальных ферментов для осаживания ЦСС.
- Оптимизировать состав ферментного комплекса за счёт включения вспомогательных ферментов (ПМО, БГЛ).
- Получить ФП, содержащие вспомогательные ферменты, и ФП, содержащие “основные” ферменты.
- Проанализировать осаживающую способность новых ФП, содержащих мутантные формы ЦБГ1д и ЭГ2д, с использованием препаратов вспомогательных ферментов (ПМО, БГЛ) при биоконверсии различных видов ЦСС.

## Экспериментальная часть

### 4. Объекты исследования и методики экспериментов

#### 4.1. Ферментные препараты (ФП)

В работе были использованы ФП, разработанные и полученные в лаборатории биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН.

*ФП целлюлаз на основе штаммов-продуцентов гриба P.verruculosum:*

- В1-537 – лабораторный ФП на основе КЖ ауксотрофного штамма *P.verruculosum* Δ*niaD*; данный штамм являлся исходным для большинства генно-инженерных манипуляций.
- PV-ПМО – лабораторный ФП на основе КЖ рекомбинантного штамма *P.verruculosum* с высоким содержанием гомологичной ПМО.
- PV-БГЛ – лабораторный ФП на основе КЖ рекомбинантного штамма *P.verruculosum*, секретирующего БГЛ *A.niger* под контролем промотора гена *cbhI*.
- PV-ПМО-БГЛ – лабораторный ФП на основе КЖ рекомбинантного штамма *P.verruculosum* с высоким содержанием гомологичной ПМО и гетерологичной БГЛ *A.niger*.
- PV-ЦБГ1д (#3.749.2) – лабораторный ФП на основе КЖ рекомбинантного штамма *P.verruculosum* с высоким содержанием мутантной ЦБГ1д N194A (плазмида 626, несущая ген *cbh1<sup>dg</sup>*, клон 9).
- PV-ЭГ2д (#3.761.2) – лабораторный ФП на основе КЖ рекомбинантного штамма *P.verruculosum* с высоким содержанием мутантной ЭГ2д N45A (плазмида 627, несущая ген *egl2<sup>dg</sup>*, клон В12).
- PV-ЦБГ1д-ЭГ2д (#3.750.1) – лабораторный ФП на основе КЖ рекомбинантного штамма *P.verruculosum* с высоким содержанием ЦБГ1д N194A и ЭГ2д N45A (плазмиды 626 и 627, несущие гены *cbh1<sup>dg</sup>* и *egl2<sup>dg</sup>*, клон А2).
- PV-ЦБГ1д-ЭГ1 (#3.752.2) – лабораторный ФП на основе КЖ рекомбинантного штамма *P.verruculosum* с высоким содержанием ЦБГ1д N194A и гетерологичной ЭГ1 *T.reesei* (плазмиды 73 и 626, несущие гены *cbh1<sup>dg</sup>* и *egl1*, клон 18).
- PV-ЭГ1-ЭГ2д (#3.753.1) – лабораторный ФП на основе КЖ рекомбинантного штамма *P.verruculosum* с высоким содержанием ЭГ2д N45A и гетерологичной ЭГ1 *T.reesei* (плазмиды 73 и 627, несущие гены *egl1* и *egl2<sup>dg</sup>*, клон В4).

- PV-ЭГ1-БГЛ (#3.762.2) – лабораторный ФП на основе КЖ рекомбинантного штамма *P.verruculosum* с высоким содержанием гетерологичных ЭГ1 *T.reesei*. и БГЛ *A.niger*.
- *Агроцелл Плюс* (#3438) – коммерческий препарат производства ООО «Агрофермент» (Россия), полученный на основе штамма *P.verruculosum* 105 с увеличенным содержанием гомологичной ЭГ2н и гетерологичной ЭГ1 *T.reesei*.
- *Агроксил Премиум* (#3388) – коммерческий препарат производства ООО «Агрофермент» (Россия), полученный на основе штамма *P.verruculosum* X8 с увеличенным содержанием гомологичной ЭГ2н и гетерологичной КсилЕ *P.canescens*.  
ФП целлюлаз на основе штаммов-продуцентов гриба *P.canescens*:
- РСА-ЦБГ1д – лабораторный ФП на основе КЖ рекомбинантного штамма *P.canescens* с увеличенным содержанием мутантной формы гетерологичной ЦБГ1д N194А.
- РСА-ЭГ2д – лабораторный ФП на основе КЖ рекомбинантного штамма *P.canescens* с увеличенным содержанием мутантной формы гетерологичной ЭГ2д N45А.

#### 4.2. Ферменты

Для сравнения каталитических свойств и определения оптимального состава ферментного комплекса для гидролиза растительных субстратов использовали индивидуальные ферменты:

- БГЛ *A.niger* – выделена из лабораторного препарата PV-БГЛ;
- КсилЕ *P.canescens* – выделена из промышленного препарата Агроксил Премиум;
- ЭГ1 *T.reesei* – выделена из промышленного препарата Агроцелл Плюс;
- ЭГ2н *P.verruculosum* – выделена из лабораторного препарата В1-537;
- ЭГ2д *P.verruculosum* – выделена из лабораторного препарата РСА-ЭГ2д;
- ПМО *P.verruculosum* – выделена из лабораторного препарата PV-ПМО;
- ЦБГ1н *P.verruculosum* – выделена из лабораторного препарата В1-537;
- ЦБГ1д *P.verruculosum* – выделена из лабораторного препарата РСА-ЦБГд;
- ЦБГ2 *P.verruculosum* – выделена из лабораторного препарата В1-537.

#### 4.3. Субстраты

В качестве субстратов для определения ферментативной активности были использованы МКЦ («Vitek Company», Россия), карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) («Sigma», США), *n*-НФ-β-D-глюкопиранозид (*n*-НФ-β-Глк) («Sigma», США), 2,6-диметоксифенол (2,6-ДМФ) («Thermo Fisher Scientific Inc.», Waltman, MA, США), пероксид водорода (3%-ный, ООО «Тульская фармацевтическая фабрика», Россия), ксилан из бука («Sigma», США), арабиноксилан из пшеницы («Megazyme», Ирландия) и ксилоглюкан из тамаринда («Megazyme», Ирландия).

Для исследования гидролитической способности ферментов и препаратов в качестве субстратов были использованы МКЦ (РН-101, «Sigma», США), аморфная целлюлоза (АЦ), полученная из МКЦ регенерацией из раствора фосфорной кислоты по методу Вуда [210], сульфатная небелёная лиственная целлюлоза (СНЛЦ, АО «Архангельский ЦБК», Новодвинск), сульфатная небелёная хвойная целлюлоза (СНХЦ, АО «Архангельский ЦБК», Новодвинск) и предобработанный щёлочью тростник (ЩТ; условия предобработки: гидромодуль 10, 1,5% NaOH, 1 ч, 120°C).

#### 4.4. Реактивы

При изготовлении пластин (70 × 80 × 0,75 мм) с полиакриламидным гелем (ПААГ) для электрофореза в денатурирующих условиях с концентрирующим (4%) и разделяющим (12%) гелями использовали реактивы и наборы фирм «Reanal» (Венгрия), «Sigma» и «Bio-Rad Laboratories» (США). Окраску белка в гелях производили красителем Coomassie-Brilliant Blue R-250 фирмы «Ferak» (ФРГ). Перед электрофорезом исследуемые растворы ферментов предварительно обрабатывали раствором 1% додецилсульфата натрия (ДДС) фирмы «Химмед» (Россия) и 5% β-меркаптоэтанола фирмы «Helicon» (Россия) при 100°C в течение 5-10 мин.

В качестве стандартов для ДДС-электрофореза использовали смеси белков фирмы «Sigma» (США), включающие α-лактоальбумин (14,2 кДа), соевый ингибитор трипсина (20,1 кДа), гидролизованный бычий трипсиноген (24,0 кДа), глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу (36,0 кДа), овальбумин (45,0 кДа), бычий сывороточный альбумин (66,0 кДа), β-галактозидазу (116,0 кДа).

Для приготовления буферных растворов и хроматографических элюентов использовали реактивы марок х.ч., ч.д.а. и о.с.ч., производимые фирмами «Pharmacia Biotech», «Sigma», «ICN», «Bio-Rad Laboratories», «Реахим», «Химмед», «Panreac», «Helicon», «GE Healthcare». Растворы, использовавшиеся в качестве элюентов для хроматографии, фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм с помощью водоструйного насоса с последующей обработкой ультразвуком в течение 10 мин.

Для культивирования микроорганизмов использовали жидкую среду Лурия-Бертани («Ambresco», США), агар бактериологический («Panreac QUIMICA SAU», Испания), свекловичный жом, пептон («ДиаМ», Россия), неорганические соли марки ч.д.а. или х.ч. производства «Helicon» и «ДиаМ» (Россия).

#### 4.5. Получение культуральных жидкостей (КЖ) и сухих препаратов

Используемые лабораторные ФП представляли собой лиофилизированные фильтраты КЖ, полученных в 1-литровых ферментёрах с использованием биореакторов фирмы «Проинтех»

(Россия). Состав культуральных сред (в г/л): МКЦ – 60, глюкоза – 40, пшеничные отруби – 10, дрожжевой экстракт – 10,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 7,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,3. Все реактивы производства «Helicon» и «ДиаМ» (Россия). Время ферментации составляло 144 ч. Процесс культивирования проводили без дополнительных подпиток и добавок солей.

В ряде случаев штаммы *P.verruculosum* культивировали в качалочных колбах с ферментационной средой для *P.verruculosum*, содержащей (г/л) пшеничные отруби – 20, дрожжевой экстракт – 20, МКЦ – 40,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 10,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3 и  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,3 (объем среды 100 мл). Все реактивы производства «Helicon» и «ДиаМ» (Россия). Культивирование проводили на термостатируемой качалке Multitron Standard («Infors», Швейцария) в течение 6 суток при 32°C.

Полученные КЖ замораживали при -60°C и сушили на лиофильной сушке Virtis Benchtop 9L Pro («SP Scientific», США).

#### **4.6. Хроматографические сорбенты и системы**

Для обессоливания и фракционирования ферментных препаратов использовали следующие хроматографические носители: для гель-фильтрации – Bio Gel P4 («Bio-Rad», США), для анионообменной хроматографии среднего давления – Source 15Q («GE Healthcare», Великобритания), для гидрофобной хроматографии среднего давления – Source 15 Iso («GE Healthcare», Великобритания).

#### **4.7. Методы определения активности ферментов и концентрации белка**

##### Определение активности по отношению к полисахаридным субстратам

Ферментативные активности по отношению к КМЦ, ксилану, арабиноксилану и ксиланоглюкану определяли по начальной скорости накопления восстанавливающих сахаров (ВС), высвобождаемых из 5 г/л субстрата при pH 5,0 и 50°C, как описано в работе [211]. Активность к МКЦ определяли по начальной скорости накопления ВС, высвобождаемых из 5 г/л субстрата при pH 5,0, 50°C и постоянном перемешивании, как описано в работе [212]. Концентрацию ВС определяли методом Шомоди-Нельсона [213]. Для построения калибровочного графика были использованы растворы с различными концентрациями глюкозы в диапазоне 0,01–0,2 г/л. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль ВС (в эквивалентах глюкозы) за 1 мин.

##### Определение активности к 2,6-ДМФ

Активность ПМО с использованием 2,6-ДМФ в качестве модельного субстрата определяли согласно методике, описанной в работе [214]. В пробирке объемом 2 мл смешивали

860 мкл 0,1 М ацетатного буфера (рН 5,0), 100 мкл запасного раствора 2,6-ДМФ (10 мМ) в том же буфере и 20 мкл 5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, после чего смесь предварительно инкубировали при 50°C в течение 5 мин. Далее добавляли 20 мкл раствора фермента, разбавленного до предварительно подобранной концентрации, и отмечали начало ферментативной реакции. После 5 мин инкубации реакционной смеси измеряли оптическую плотность на длине волны 469 нм относительно раствора сравнения, содержащего те же самые вещества, кроме фермента (вместо раствора фермента в реакционную смесь вносили 20 мкл буфера). Концентрацию хромогенного продукта рассчитывали, используя коэффициент экстинкции 53200 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> [214]. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль продукта в минуту.

#### Определение активности к *n*-НФ-β-Глк

Активность к *n*-НФ-β-Глк определяли, измеряя начальную скорость образования *n*-нитрофенола в ходе ферментативного гидролиза субстрата с концентрацией 1 мМ при рН 5,0 и 50°C [215]. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль *n*-нитрофенола в минуту.

#### Определение концентрации белка

Содержание белка в мультиферментных препаратах определяли методом Лоури [216], используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта. Концентрацию очищенных белков определяли методом Лоури или спектрофотометрически при 280 нм, используя коэффициенты экстинкции, рассчитанные по известным соответствующим аминокислотным последовательностям с помощью программы ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

### **4.8. Ферментативный гидролиз ЦСС**

Осахаривание ЦСС проводили в двух вариантах: в пробирках объёмом 2 мл (объём реакционной смеси 1,5 мл) протекал гидролиз субстратов под действием индивидуальных ферментов, в пластиковых контейнерах объёмом 30 мл (объём реакционной смеси 10 мл) – под действием мультиферментных препаратов и их смесей.

В первом случае МКЦ, СНЛЦ, СНХЦ и ЩТ обрабатывали в присутствии ферментов при рН 5,0, различных температурах (50, 55 и 60°C) и постоянном перемешивании при 1000 об/мин в термошейкере TS-100 («BioSan», Латвия). Концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 100 г/л, общая доза белка варьировалась от 0,25 до 2 мг/г субстрата.

Во втором случае субстраты обрабатывали в присутствии ФП при рН 5,0, 55°C, постоянном перемешивании при 150 об/мин в воздушном термостате New Brunswick Innova 40

(«Eppendorf», Германия). При анализе гидролитической способности КЖ концентрация субстрата составляла 100 г/л, объем добавляемого в реакционную смесь КЖ – 1 мл; при использовании сухих препаратов концентрация субстратов варьировалась от 100 до 300 г/л, суммарная доза белка составляла 10 мг/г субстрата.

Через определенные промежутки времени после начала ферментативной реакции из реакционной смеси отбирали аликвоты, центрифугировали 3 мин при 14000 об/мин и в надосадочной жидкости определяли концентрацию ВС методом Шомоди-Нельсона.

#### Метод определения концентрации ВС

Концентрацию ВС определяли методом Шомоди-Нельсона [213], отбирая аликвоты реакционных смесей и подбирая необходимые разбавления, чтобы значения получаемых оптических плотностей попадали в доверительный интервал. Для измерения использовали спектрофотометр Cary 50 UV-Vis («Varian», США). Концентрацию сахаров рассчитывали по калибровочному графику с использованием раствора глюкозы в качестве стандарта.

### **4.9. Определение состава низкомолекулярных сахаров**

Состав низкомолекулярных сахаров в гидролизатах проводили с помощью ВЭЖХ на хроматографической системе Agilent 1100 Series («Agilent Technologies», США) на колонке с привитой аминофазой Kromasil 100-5-NH<sub>2</sub> («Nouryon», Нидерланды). Для разделения использовали элюент, содержащий 75% ацетонитрила и 25% воды. Сахара детектировали рефрактометрически. В качестве стандартов использовали глюкозу, ксилозу, арабинозу, целлобиозу и ксилобиозу.

### **4.10. Выделение и очистка индивидуальных ферментов**

Для фракционирования мультиферментных комплексов и очистки индивидуальных белков использовали жидкостную хроматографическую систему NGC Chromatography Systems («Bio-Rad», США) со спектрофотометрическим детектором.

Для выделения индивидуальных ферментов сухие ФП растворяли в 0,02 М Bis-Tris/HCl буфере pH 6,8 и обессоливали на колонке с Bio-Gel P4 (объем колонки 15 мл) с использованием той же буферной системы.

Обессоленный препарат в количестве 100 мг наносили на колонку с Source 15Q (объем колонки 10 мл), предварительно уравновешенную 0,02 М Bis-Tris/HCl буфером pH 6,8, и элюировали белки в прямом градиенте того же буфера, содержащего 1М NaCl, скорость потока 6 мл/мин.

Для дополнительной очистки белков в соответствующую фракцию добавляли  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до конечной концентрации 1,7 М и проводили гидрофобную хроматографию на колонке с Source 15 Iso (объем колонки 10 мл), уравновешенной 0,05 М Na-ацетатным буфером, содержащим 1,7 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; элюцию вели в обратном градиенте  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  от 1,7 до 0 М, скорость потока 6 мл/мин.

Фракцию, содержащую целевой фермент, обессоливали на колонке с Bio-Gel P4, используя 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 5,0.

Для оценки чистоты фермента проводили его электрофорез в 12%-ном ДДС-ПААГ на приборе Mini Protean II («Bio-Rad», США) согласно руководству к прибору.

#### **4.11. Анализ состава ФП методом денситометрии**

Белки препарата подвергали электрофоретическому разделению, белковые полосы прокрашивали кумасси, далее с помощью программы GelAnalyzer определяли “вес” каждой полосы, т.е. интенсивность её окраски. Процентное содержание отдельной полосы на электрофореграмме рассчитывали, поделив на общую интенсивность всех полос. Данный метод позволяет определить содержание отдельных белков при условии, что массы белков различаются достаточно.

#### **4.12. Анализ состава ФП методом тонкого хроматографического фракционирования**

Анализ компонентного состава ФП проводился в соответствии с методами, изложенными в работах [159, 217]. На первой стадии проводили хроматографическое фракционирование ФП (10 мг белка) с использованием анионообменного носителя Source 15Q (объем колонки 1 мл, скорость потока 1 мл/мин). Для каждой белковой фракции определяли активности к ряду субстратов и концентрацию белка, а также получали ДДС-ПААГ-электрофореграмму. Компонентный состав каждой фракции был идентифицирован на основе активностей и масс-спектрометрических данных соответствующих белковых полос с геля [218, 219].

Идентифицированные белки, имеющие чистоту более 90% в соответствующих фракциях согласно данным ДДС-ПААГ-электрофореза, рассматривались как отдельные ферменты, а содержание соответствующих ферментов в исходном неочищенном мультиферментном препарате рассчитывалось как отношение содержания белка в этой фракции к общему содержанию белка во всех полученных фракциях. Некоторые белковые фракции по данным ДДС-ПААГ-электрофореза содержали более одного фермента (чистота менее 90%). Тогда для данной фракции применяли метод денситометрии: сначала оценивали долю фермента во фракции на основе интенсивности его полосы на электрофоретическом геле, а затем, зная

содержание белка в этой фракции и долю фермента, рассчитывали его содержание в исходном препарате.

#### **4.13. Идентификация ферментов**

Идентификацию ферментов осуществляли методом пептидного картирования после расщепления белков, содержащихся в соответствующих полосах ДДС-ПААГ, с помощью трипсина («Promega», США). МАЛДИ масс-спектрометрия гидролизатов проводилась сотрудниками ЦК ФИЦ Биотехнологии РАН «Промышленные биотехнологии» на масс-спектрометре UltrafleXtreme («Bruker Daltonik GmbH», Германия). Анализ данных масс-спектра проводился с использованием онлайн-ресурса FindPept (<https://web.expasy.org/findpept/>).

#### **4.14. Определение адсорбционной способности ферментов**

Адсорбционную способность ферментов определяли при 6°C, концентрации МКЦ 25 г/л и концентрации ферментов 1 г/л в течение 30 мин (0,1М Na-ацетатный буфер, pH 5,0). Остаточную концентрацию белка определяли методом Лоури. Результаты выражали в процентах адсорбировавшегося белка от исходной концентрации в растворе [212].

## Результаты и обсуждение

Как отмечалось ранее, для увеличения эффективности биоконверсии ЦСС существует несколько подходов (раздел 3.1). В рамках нашей работы мы сфокусируемся на двух из них, а именно на улучшении каталитических свойств ключевых ферментов целлюлазного комплекса и на добавлении новых ферментов в состав комплекса.

### 5. Характеристика используемых ферментов

Для эффективного гидролиза ЦСС ферментный комплекс должен содержать основные (ЦБГ, ЭГ) и вспомогательные (БГ, ПМО) целлюлолитические ферменты, а также при необходимости гемицеллюлазы в оптимальном соотношении, обеспечивающим наибольшую скорость превращения субстрата в продукты. В работе были использованы очищенные исходные и мутантные формы ЦБГ1 и ЭГ2 *P.verruculosum* как ключевые ферменты целлюлазного комплекса гриба. ЦБГ2 и исходные формы ЦБГ1н и ЭГ2н были выделены из ФП В1-537 по методикам, описанным в работах [210, 220]. Дегликозилированные формы ЦБГ1д и ЭГ2д были выделены из препаратов РСА-ЦБГ1д и РСА-ЭГ2д, полученных на основе рекомбинантных штаммов *P.canescens* (препараты были предоставлены А.С. Доценко). ПМО выделяли по методике [221] из препарата РV-ПМО с высоким содержанием ПМО, рекомбинантную БГЛ *A.niger* – в соответствии с [222] из препарата РV-БГЛ, ЭГ1 *T.reesei* и КсилЕ *P.canescens* – из промышленных препаратов Агроцелл Плюс и Агроксил Премиум.

#### 5.1. Выделение индивидуальных ферментов

Для выделения ферментов использовали метод последовательной анионообменной и гидрофобной хроматографии. Выделение проводили из препаратов на основе разных штаммов *P.verruculosum* и *P.canescens*. Схема очистки ферментов состояла из следующих этапов. Белки мультиферментного препарата переосаждали сульфатом аммония для того, чтобы избавиться от примесей культуральной среды, обессоливали с помощью гель-проникающей хроматографии на носителе Р4, затем подвергали хроматографическому разделению на колонке с анионообменником Source 15Q в градиенте NaCl. В полученных фракциях определяли активности к специфическим субстратам, чистоту белковых полос оценивали методом ДДС-электрофореза. При необходимости проводили вторую стадию очистки – гидрофобную хроматографию. Для этого в отобранные фракции, содержащие целевые ферменты, добавляли при перемешивании  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до концентрации 1,7 М, затем проводили хроматографическое

разделение на колонке с Source 15Iso в обратном градиенте  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Очищенные таким образом белки обессоливали с помощью гель-проникающей хроматографии.

В случае ЭГ2н достаточно было проведения только первой стадии, потому что этот фермент был единственным, который элюировался при концентрации около 0,4 М NaCl. ПМО элюировалась при 0,20–0,25 М NaCl, БГЛ – при 0,25–0,30 М NaCl. Вторая стадия гидрофобной хроматографии в случае ПМО и БГЛ проводилась для более тщательной очистки.

ЦБГ1, ЦБГ2н, ЭГ1 и КсилЕ элюировались в начале градиента при анионообменной хроматографии в промежутке от 0,05 до 0,2 М NaCl, и их пики накладывались друг на друга. Для выделения этих ферментов в индивидуальном виде была необходима вторая стадия гидрофобной хроматографии. На этом этапе ферменты хорошо разделялись, так как элюировались при разных концентрациях  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : КсилЕ – 1,5–1,3 М, ЦБГ2 – 1,2–1,0 М, ЦБГ1н – 1,0–0,7 М, ЭГ1 – 0,7–0,5 М.

Дегликозилированные формы ЦБГ1д и ЭГ2д выделяли из препаратов РСА-ЦБГ1д и РСА-ЭГ2д, полученных на основе рекомбинантных штаммов гриба *P.canescens*, внеклеточный комплекс которого не содержит собственных целлюлаз, что облегчает выделение ЦБГ1д и ЭГ2д.

При выделении ЦБГ1д (рис. 10) в полученных фракциях определяли активности к МКЦ (специфическому субстрату для ЦБГ) и к арабиноксилану, поскольку мажорный компонент внеклеточного комплекса гриба *P.canescens* арабиноксилан-арабинофурангидролаза (АКГ) имеет близкое к ЦБГ1д время элюции в используемых условиях хроматографического фракционирования. Для выделения ЦБГ1д объединяли фракции, в которых удельная активность к МКЦ превышала 0,22 ед/мг белка (таблица 3).

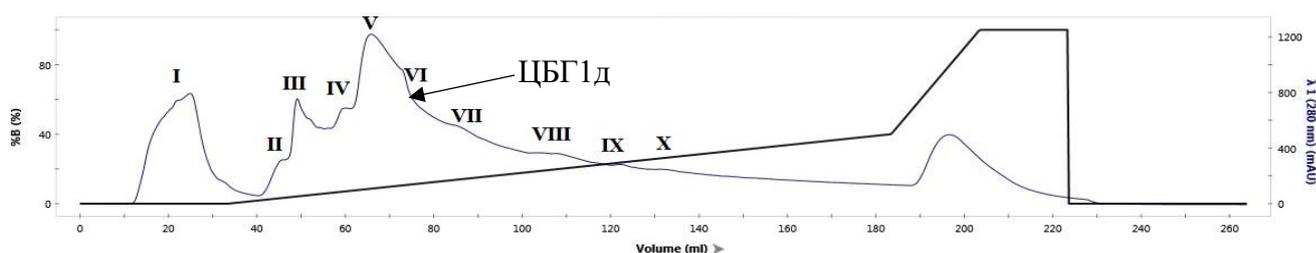


Рисунок 10. Хроматограмма фракционирования препарата РСА-ЦБГ1д на анионообменнике Source 15Q.

По результатам анализа были отобраны фракции V–VIII (данные фракции элюировались при 0,10–0,20 М NaCl), в которых наблюдалась относительно высокая активность к МКЦ, при этом активность к арабиноксилану была невелика. В объединённых фракциях удельная

активность к МКЦ составляла 0,35 ед/мг, к арабиноксилану – 6,5 ед/мг (10% от максимальной удельной активности АКГ).

Таблица 3. Концентрация белка (мг/мл) и специфические активности (ед/мг) во фракциях, полученных при очистке ЦБГ1д в ходе двухстадийного разделения ФП РСА-ЦБГ1д

Фракция	Концентрация белка	Активность к МКЦ	Активность к арабиноксилану
после первой стадии – анионообменной хроматографии			
I	0,42±0,02	0,02±0,01	42±2
II	0,24±0,01	0,06±0,01	64±3
III	0,46±0,02	0,11±0,01	33±2
IV	0,57±0,03	0,19±0,01	17±1
V	0,96±0,05	0,32±0,02	8,4±0,4
VI	0,72±0,03	0,51±0,02	4,2±0,2
VII	0,43±0,02	0,43±0,02	2,8±0,1
VIII	0,31±0,01	0,22±0,01	1,3±0,1
IX	0,27±0,01	0,13±0,01	0,5±0,1
X	0,24±0,01	0,07±0,01	0,3±0,1
после второй стадии – гидрофобной хроматографии			
XI	0,36±0,02	0,02±0,01	27±1
XII	0,32±0,01	0,07±0,01	56±3
XIII	0,35±0,01	0,07±0,01	38±2
XIV	0,35±0,02	0,27±0,02	21±1
XV	0,40±0,02	0,95±0,05	5,5±0,2
XVI	0,24±0,01	0,84±0,04	2,0±0,1
XVII	0,15±0,01	0,81±0,04	1,2±0,1

Объединенные фракции V–VIII подвергали второй стадии очистки с помощью гидрофобной хроматографии (рис. 11). Для идентификации целевых ферментов во фракциях снова измеряли активность к специфическим субстратам (табл. 3). Фракции XV–XVII, содержащие ЦБГ1д, элюировались при 1,0–0,7 М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Фракции XV–XVII после гидрофобной хроматографии были объединены, сконцентрированы и обессолены. В результате активность полученной фракции, содержащей преимущественно ЦБГ1д, составила 0,89 ед/мг по отношению к МКЦ и 2,1 ед/мг по отношению

к арабиноксилану (меньше 5% от максимальной активности данного фермента) при концентрации белка 0,45 мг/мл.

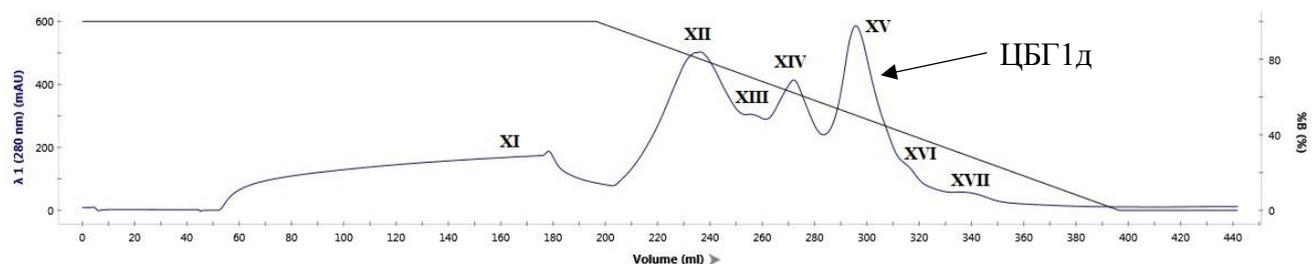


Рисунок 11. Хроматограмма фракционирования объединенных фракций V–VIII, содержащих ЦБГ1д, на гидрофобном носителе Source 15Iso.

Для выделения ЭГ2д из препарата РСА-ЭГ2д на первой стадии также проводили анионообменную хроматографию (рис. 12), а в полученных фракциях измеряли активность к КМЦ – субстрату, к которому ЭГ2 проявляет наибольшую специфичность (табл. 4). По результатам анализа были отобраны фракции V–VI, элюирующиеся при 0,4–1,0 М NaCl – в них наблюдалась наибольшая активность к КМЦ. Удельная активность к КМЦ в объединённой фракции составила 30 ед/мг.

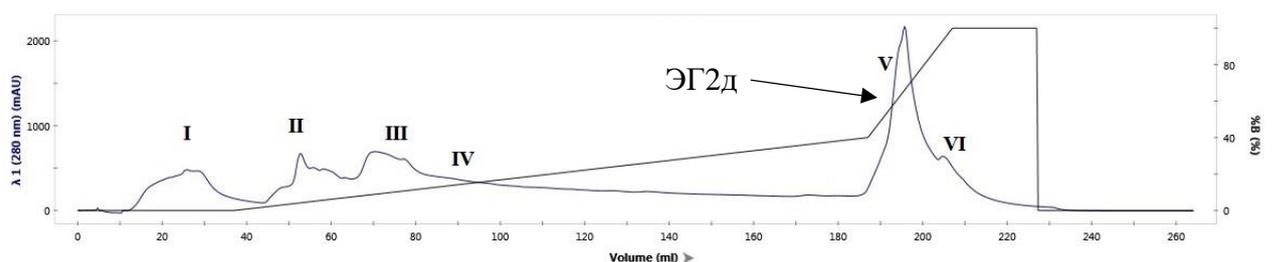


Рисунок 12. Хроматограмма фракционирования препарата РСА-ЭГ2д на анионообменнике Source 15Q.

Таблица 4. Концентрация белка (мг/мл) и активность (ед/мг) во фракциях, полученных при выделении ЭГ2д из препарата РСА-ЭГ2д с помощью анионообменной хроматографии

Фракция	Концентрация белка	Активность к КМЦ
I	0,8±0,1	0,5±0,1
II	0,7±0,1	0,4±0,1
III	1,0±0,1	0,2±0,1
IV	0,5±0,1	0,3±0,1
V	1,8±0,2	33±2
VI	1,1±0,1	16±1

Объединенные фракции V–VI далее подвергли фракционированию на гидрофобном носителе Source 15Iso (рис. 13). Фракция, содержащая ЭГ2д, элюировалась при 0,9–0,4 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . После ее концентрирования и обессоливания активность к МКЦ составила 40 ед/мг при концентрации белка 0,9 г/л.

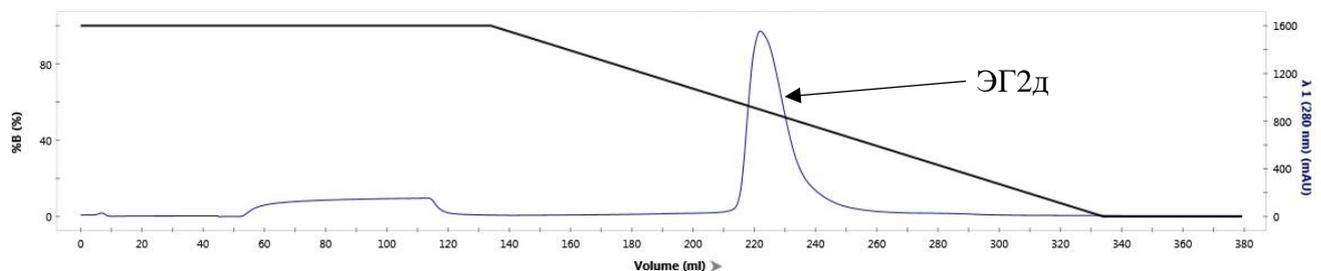


Рисунок 13. Хроматограмма фракционирования объединенных фракций V–VI, содержащих ЭГ2д, на гидрофобном носителе Source 15Iso.

На рис. 14 представлена ПААГ-электрофореграмма очищенных ферментов. Чистота исследуемых белков составляла более 90%; дополнительные полосы, наблюдаемые в случае ЦБГ1н и ЦБГ2, соответствовали различным низкомолекулярным формам ферментов.

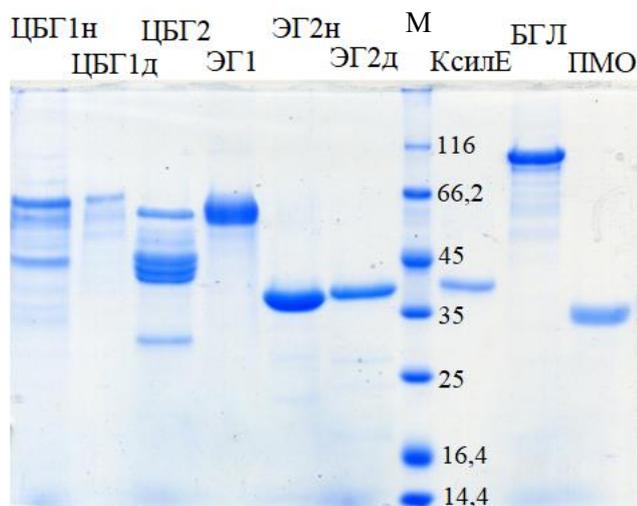


Рисунок 14. ПААГ-электрофорез использованных очищенных ферментов.

## 5.2. Свойства индивидуальных ферментов

Для всех использованных в работе ферментов были определены их активности по отношению к ряду субстратов (табл. 5). Активностью по отношению к МКЦ обладали только ЦБГ и ЭГ1. Наибольшую активность проявляла ЦБГ1д (0,89 ед/мг белка), активность ЦБГ1н была ниже (0,65 ед/мг), а наименьшая – у ЦБГ2 (0,16 ед/мг); активность ЭГ1 по отношению к МКЦ составляла 0,41 ед/мг.

Таблица 5. Активности очищенных ферментов к ряду субстратов (ед/мг белка) и кинетические параметры гидролиза специфических субстратов (выделены жирным) при pH 5,0 и 50°C (н.д. – нет данных).

Фермент	МКЦ	КМЦ	Ксилан	<i>n</i> -НФ-β-Глк	Ксило-глюкан	2,6-ДМФ	$K_m$ каж, мг/мл	$K_{cat}$ каж, с <sup>-1</sup>
ЦБГ1н	<b>0,65±0,03</b>	3,7±0,1	15±1	3,1±0,1	0	0	14±1	0,29±0,01
ЦБГ1д	<b>0,89±0,07</b>	3,2±0,6	17±1	0	0	0	10±1	0,34±0,01
ЦБГ2	<b>0,16±0,01</b>	2,0±0,1	0	0	0	0	20±2	0,12±0,01
ЭГ1	0,41±0,03	37±2	8±1	1,5±0,1	80±5	0	н.д.	н.д.
ЭГ2н	0	<b>33±2</b>	0	0	0	0	19±2	275±12
ЭГ2д	0	<b>40±3</b>	0	0	0	0	22±2	166±12
КсилЕ	0	0	77±5	0	1,1±0,2	0	н.д.	н.д.
БГЛ	0	3,0±0,1	0	<b>110±9</b>	0	0	0,60±0,01	260±10
ПМО	0	0	0	0	0	<b>105±4</b>	6,4±0,4	8,2±0,2

Активность по отношению к КМЦ проявляли все ферменты, кроме ПМО и КсилЕ. ЭГ2д обладала более высокой активностью к данному субстрату по сравнению с ЭГ2н (40 и 33 ед/мг соответственно); активность ЭГ1 по отношению к КМЦ также была высокой (37 ед/мг). Для остальных ферментов значения активности составляли 2,0-3,7 ед/мг белка.

Наибольшей активностью по отношению к ксилану обладала КсилЕ (77 ед/мг). Известно, что ЦБГ1 в отличие от ЦБГ2 проявляет неспецифическую активность к ксилану, а также способна гидролизовать синтетические производные низкомолекулярных сахаров (целлобиозы, лактозы). Значения неспецифической активности ЦБГ1н и ЦБГ1д к ксилану были близки и составляли 15 и 17 ед/мг соответственно. ЭГ1 также проявляла активность по отношению к ксилану (8 ед/мг). Для ЭГ1 была характерна высокая активность по отношению к ксилотриосу (80 ед/мг).

Наибольшей активностью по отношению к *n*-НФ-β-Глк обладала БГЛ (110 ед/мг белка). Активность к 2,6-ДМФ проявляла только ПМО (105 ед/мг).

Для определения кинетических параметров проводили эксперименты по варьированию концентрации специфического для каждого фермента субстрата в стандартных условиях (pH 5,0, 50°C): МКЦ в случае ЦБГ, КМЦ в случае ЭГ2, *n*-НФ-β-Глк в случае БГЛ, 2,6-ДМФ в случае ПМО.

Значения  $K_m$ , каж. для ферментов, проявлявших активность к полисахаридным субстратам, находились примерно в одном диапазоне (10–22 мг/мл), но для БГЛ оно было значительно ниже (0,60 мг/мл) при использовании *n*-НФ-β-Глк в качестве субстрата.

Значения  $K_{cat, каж}$  для ЦБГ и ПМО были достаточно низкими (0,12-0,34 с<sup>-1</sup>), что можно объяснить тем, что данные ферменты взаимодействуют с кристаллическими зонами субстрата, реакционная способность которых сама по себе не велика. Для ферментов, воздействующих на растворимые субстраты, величины  $K_{cat, каж}$  были на порядки выше – 166 и 275 для ЭГ2д и ЭГ2н соответственно и 260 с<sup>-1</sup> для БГЛ.

Кинетические параметры дегликозилированных и исходных форм ЦБГ1 и ЭГ2 различались: для ЦБГ1д наблюдалось снижение значения  $K_m, каж$  и увеличение  $K_{cat, каж}$ , что коррелировало с увеличением активности данной формы фермента. Это говорит о том, что проведённая аминокислотная замена N45A привела к улучшению каталитических характеристик фермента. Вероятно, отсутствие гликана в данной позиции положительно сказывается на процессивности фермента.

Значения  $K_m, каж$  дегликозилированной и нативной форм ЭГ2 оказались одинаковыми, тогда как значение  $K_{cat, каж}$  для ЭГ2д значительно уменьшилось: 166 против 275 с<sup>-1</sup> для ЭГ2н. Это, возможно, объясняется тем, что гликан на поверхности белковой глобулы влияет на скорость сорбции/десорбции фермента с поверхности полисахаридной цепи; в этом случае отсутствие гликана увеличивает скорость диссоциации.

Для всех ферментов были изучены их биохимические и физико-химические параметры (табл. 6). При определении рН-, температурного оптимумов и стабильности ферментов использовали их специфические субстраты: МКЦ для ЦБГ, КМЦ для ЭГ, *n*-НФ-β-Глк для БГЛ, 2,6-ДМФ для ПМО, ксилан для КсилЕ. Для изучения стабильности растворы ферментов инкубировали при различных температурах и с течением времени определяли остаточную активность. В таблице указано время полуинактивации и температура, при которой оно было определено. Для измерения степени адсорбции ферменты выдерживали с МКЦ в течение 30 мин при перемешивании и низкой температуре (6°С) и сравнивали исходную и остаточную концентрацию белка в надосадочной жидкости.

рН- и температурный оптимумы, стабильность и адсорбционная способность для нативной и мутантной форм ЦБГ1 были идентичными.

В случае ЭГ2 степень адсорбции, температурный оптимум и стабильность не подверглись изменению, тогда как рН-оптимум для мутантной формы сдвинулся к значению рН 5,0 (для ЭГ2н он составлял 4,5).

В целом, для всех ферментов рН-оптимум располагался в кислой области (4,0–5,0) кроме ПМО, для которой он составлял 7,5. Также ПМО обладала наиболее низким температурным оптимумом 43°С. Температурный оптимум ЦБГ1н и ЦБГ1д составлял 55°С, ЭГ1 – 60°С, ЦБГ2 и БГЛ – 65°С, а для обеих форм ЭГ2 он оказался самым высоким – 70°С. Степень адсорбции напрямую зависела от наличия ЦСМ у ферментов. Для ЦБГ и ЭГ1 – ферментов, в структуре

которых ЦСМ присутствует, – степень адсорбции была порядка 80–90%, тогда как для остальных ферментов она была меньше 10%.

Таблица 6. Биохимические и физико-химические свойства очищенных ферментов.

Фермент	Масса, кДа	pH-оптимум	T-оптимум, °C	Стабильность, мин	Степень адсорбции, %
ЦБГ1н	66	4,0	55	13 (65°C)	88±4
ЦБГ1д	66	4,0	55	13 (65°C)	85±4
ЦБГ2	60	4,0	65	20 (65°C)	82±3
ЭГ2н	40	4,5	70	17 (80°C)	7,0±0,3
ЭГ2д	40	5,0	70	17 (80°C)	7,1±0,2
ЭГ1	60	4,5	60	1,5 (70°C)	78±3
КсилЕ	40	5,0	65	7 (70°C)	8,5±0,6
БГЛ	99	4,5	65	15 (80°C)	6,0±0,4
ПМО	33	7,5	43	20 (60°C)	5,0±0,3

\*\*\*

Таким образом были выделены в индивидуальном виде 9 ферментов с чистотой более 90%. Высокой специфичностью к кристаллической (нерастворимой) целлюлозе обладали все ЦБГ и ЭГ1, к растворимой – все ЭГ. Большинство ферментов проявляла максимум активности в кислой области pH за исключением ПМО (предпочтительней нейтральная область pH). Диапазон температур, в котором ферменты проявляли высокую активность и были стабильны, составлял 50-60°C.

## 6. Сравнение гидролитической способности индивидуальных целлюлаз

Была проведена оценка гидролитической способности нативных и мутантных форм ЦБГ1 и ЭГ2 *P.verruculosum* и ЭГ1 из *T.reesei*. С их помощью был осуществлён гидролиз ЦСС различного происхождения и состава. В качестве объектов гидролиза выступали МКЦ, СНЛЦ, СНХЦ и ЩТ.

МКЦ является модельным субстратом в изучении процессов ферментативного гидролиза. Этот субстрат представляет из себя целлюлозу с крайне высоким ИК, в которой практически отсутствуют зоны аморфности (~ 2%).

Сульфатная небелёная лиственная целлюлоза (СНЛЦ) – полуфабрикат целлюлозно-бумажного производства – была получена из лиственных пород древесины (берёза и осина в соотношении 1/1). 85% сухих веществ субстрата составляла целлюлоза, 11% – различные гемицеллюлозы, около 2% – остаточный лигнин. Этот субстрат можно рассматривать как образец лиственных пород древесины, избавленный от большинства компонентов, мешающих ферментативному гидролизу. Сульфатная небелёная хвойная целлюлоза (СНХЦ) – субстрат, полученный из хвойных пород деревьев на целлюлозно-бумажном производстве по сходной схеме.

Предобработанный щёлочью тростник (ЩТ) – продукт переработки обычного (не сахарного) тростника. Это достаточно распространённый и инертный субстрат. Ранее нами было установлено, что лучшим способом его предобработки является щелочной гидролиз. Оценка реакционной способности данного субстрата показала, что в составе ЩТ помимо целлюлозы (60%) присутствуют гемицеллюлозы (в основном ксилан) (20%) и остаточное количество лигнина (13%).

Для каждого субстрата (100 г/л) варьировали дозировку ферментов от 0,25 до 2,0 мг/г субстрата, 10% из которых заменяли на очищенную БГЛ. Помимо этого, для увеличения эффективности гидролиза и сравнения свойств ферментов гидролиз проводили при разных температурах. В таблице 7 приведен выход ВС после 96 ч гидролиза субстратов под действием индивидуальных ферментов при дозировке 2 мг/г. В Приложении 1 представлены графики изменения концентрации ВС в ходе гидролиза субстратов под действием разных доз ферментов (на рис. 1.1-1.24 – под действием ЦБГ1н и ЦБГ1д, на рис. 2.1-2.24 – под действием ЭГ2н и ЭГ2д, на рис. 3.1-3.12 – под действием ЭГ1).

При сравнении действия исходной и мутантной форм ЦБГ1 на субстраты очевидным было преимущество ЦБГ1д перед ЦБГ1н, особенно четко это проявлялось при гидролизе МКЦ (субстрата с крайне высоким индексом кристалличности): при 50°C после 96 ч концентрация

сахаров в случае действия ЦБГ1д составила 24 г/л против 16 г/л в случае ЦБГ1н, т.е. прирост выхода ВС составил 50%. Аналогичные значения прироста ВС (около 50%) наблюдались при гидролизе МКЦ при 55 и 60°C: при 55°C за 96 ч гидролиза выход ВС для дегликозилированной формы составил 29 г/л, а для исходной – 19,2 г/л, а при 60°C – 16,7 и 11,2 г/л соответственно. Следует отметить, что для обеих форм ЦБГ оптимальной температурой гидролиза была 55°C: увеличение температуры от 50 до 55°C привело к увеличению выхода ВС на 20%, а при нагревании реакционной среды до 60°C значения выхода ВС уменьшились в 1,6 раза относительно лучших результатов, полученных при 55°C.

Таблица 7. Выход ВС (г/л) после 96 ч гидролиза разных видов ЦСС (100 г/л) под действием индивидуальных ферментов в концентрации 2 мг/г, pH 5,0.

Температура	Фермент	Субстрат			
		МКЦ	СНЛЦ	СНХЦ	ЩТ
50°C	ЦБГ1н	16,0±0,7	22±1	23±1	20±1
	ЦБГ1д	24±1	25±1	26±1	21±1
	ЭГ2н	1,9±0,1	1,4±0,1	2,0±0,2	4,3±0,2
	ЭГ2д	2,3±0,1	2,0±0,1	2,5±0,2	4,5±0,2
	ЭГ1	10,8±0,5	10,8±0,6	10,4±0,5	10,7±0,5
55°C	ЦБГ1н	19,2±0,8	21±1	26±1	22±1
	ЦБГ1д	29±1	27±1	30±2	23±1
	ЭГ2н	2,2±0,1	2,1±0,1	2,2±0,1	4,5±0,2
	ЭГ2д	2,4±0,1	2,4±0,1	2,5±0,2	4,7±0,4
	ЭГ1	12,5±0,6	14,5±0,7	14,8±0,7	12,8±0,6
60°C	ЦБГ1н	11,7±0,5	8,9±0,4	14,9±0,7	13,9±0,6
	ЦБГ1д	16,7±0,8	11,4±0,5	19,5±0,7	16,8±0,5
	ЭГ2н	2,4±0,1	2,2±0,2	2,3±0,2	3,9±0,2
	ЭГ2д	2,4±0,2	2,4±0,2	2,5±0,1	4,2±0,2
	ЭГ1	7,8±0,4	8,2±0,4	8,3±0,4	6,4±0,3

При гидролизе СНЛЦ и СНХЦ при разных температурах преимущество дегликозилированной формы ЦБГ1д также было очевидно, но прирост выхода ВС относительно действия нативной формы составил 13-31%. Выход сахаров при действии ЦБГ1д на эти субстраты при 50 или 55°C составил 25-30 г/л, при действии ЦБГ1н – 21-26 г/л. Наименьшая разница между действием ЦБГ1д и ЦБГ1н наблюдалась при гидролизе ЩТ. Как и в случае МКЦ

оптимальной температурой гидролиза СНЛЦ, СНХЦ и ЩТ субстратов была 55°C: преимущество перед использованием 50°C было незначительным (5-20%), а перед 60°C составляло от 1,4 до 2,4 раза.

Таким образом дегликозилированная форма ЦБГ1д оказалась эффективнее при гидролизе разных видов ЦСС. В некоторых случаях прирост концентрации ВС достигал 50% за 96 ч гидролиза. Наибольший выход сахаров наблюдался при 55°C. Предпочтительный субстрат для ЦБГ1 было выделить затруднительно: действие ферментов на любой из использованных субстратов приводило к примерно одинаковым значениям выхода ВС. Следует отметить, что в использованном диапазоне дозировки ферментов (0,25-2,0 мг/г субстрата) насыщения реакционной смеси ни одной из форм ЦБГ1 не наблюдалось (рис. 1.1-1.24 Приложения 1).

При сравнении действия исходной и мутантной форм ЭГ2 на разные виды ЦСС преимущество дегликозилированной формы было незначительным. ЭГ2 не способна гидролизовать кристаллические участки целлюлозы, поэтому выход ВС за 96 ч гидролиза что для исходной, что для мутантной форм был довольно низким. В целом выход сахаров при действии любой из форм составлял 1,4-4,7 г/л (из 100 г/л субстрата). Однако стоит отметить, что для всех температур выход ВС в случае гидролиза ЩТ был выше по сравнению с выходом при гидролизе других субстратов.

Наибольшая разница между исходной и мутантной форм ЭГ2 наблюдалась при их действии на СНЛЦ и СНХЦ при 50°C: после 96 ч гидролиза выход ВС был на 25-40% выше в случае ЭГ2д. При увеличении температуры гидролиза эта разница практически нивелировалась.

Основной особенностью поведения как ЭГ2д, так и ЭГ2н была их высокая стабильность в исследуемом диапазоне температур, и оптимальная температура гидролиза для них составляла 55-60°C: для этих температур выход ВС после 96 ч гидролиза был примерно одинаковым, а преимущество перед использованием 50°C составляло до 50% в некоторых случаях.

Таким образом дегликозилированная форма ЭГ2д оказалась немного более эффективнее, чем исходная ЭГ2н при гидролизе ЦСС. В большинстве случаев увеличение концентрации ВС за 96 ч гидролиза при дозировке фермента 2 мг/г не превышало 20%. Наибольшие концентрации сахаров были получены при 55-60°C. Можно было выделить предпочтительный для ЭГ2 субстрат – ЩТ. В использованном диапазоне дозировки ферментов (0,25-2,0 мг/г субстрата) насыщения реакционной смеси ни одной из форм ЭГ2 не наблюдалось (рис. 2.1-2.24 Приложения 1).

ЭГ1 – это фермент, относящийся к эндоглюканазам, но в отличие от большинства представителей данного типа ферментов он способен воздействовать на кристаллические участки целлюлозы, хоть и хуже, чем целлобиогидролаза. Полученные значения выходов ВС при гидролизе разного вида ЦСС оказались значительно выше, чем для ЭГ2, но ниже, чем для ЦБГ1 любой формы. Наибольший выход ВС наблюдался при действии ЭГ1 на СНЛЦ и СНХЦ и

составлял 14-15 г/л после 96 ч гидролиза при 55°C (для сравнения: действие любой формы ЭГ2 в аналогичных условиях приводило к образованию 2,0-2,5 г/л ВС, а действие любой формы ЦБГ1 – 21-30 г/л). Для ЭГ1 был характерен ярко выраженный оптимум действия при 55°C: при увеличении температуры от 50 до 55°C значения выхода ВС после 96 ч гидролиза увеличивались на 16-42% в зависимости от субстрата, а при нагревании реакционной среды до 60°C значения выхода ВС уменьшались почти в 2 раза, как и в случае ЦБГ1. В использованном диапазоне дозировки фермента (0,25-2,0 мг/г субстрата) насыщения реакционной смеси не наблюдалось (рис. 3.1-3.12 Приложения 1).

\*\*\*

Таким образом при использовании различных видов ЦСС было установлено, что индивидуальные целлюлолитические ферменты можно расположить в ряд в порядке убывания их гидролитической способности ЦБГ1д-ЦБГ1н-ЭГ1-ЭГ2д-ЭГ2н. Наибольший выход ВС в случае ЦБГ1д, ЦБГ1н и ЭГ1 наблюдался при гидролизе СНХЦ и составлял 30, 26 и 14,8 г/л соответственно, а в случае ЭГ2д и ЭГ2н наибольший выход ВС наблюдался при гидролизе ЩТ и равнялся 4,7 и 4,5 г/л. Оптимальной температурой для последующего гидролиза комплексом ферментов (Глава 7) была выбрана 55°C.

## 7. Синергизм между основными (ЭГ, ЦБГ) и вспомогательными (ПМО, БГЛ) ферментами целлюлазного комплекса

Для глубокого осахаривания ЦСС важны не только свойства индивидуальных ферментов, но и эффективность их совместного действия, так как различные ферменты целлюлазного комплекса гриба *P.veruculosum* способны оказывать положительный синергетический эффект при совместном действии на субстрат [9]. О положительном синергетическом эффекте можно говорить, если при воздействии смеси ферментов общий выход сахаров оказывается больше, чем суммарный теоретический выход, рассчитанный из значений выхода сахаров при действии индивидуальных ферментов, умноженного на долю ферментов в смеси (от 0 до 1).

В этой главе мы рассмотрим эффективность гидролиза смесями основных (ЭГ1, ЭГ2н, ЦБГ1н, ЦБГ2) и вспомогательных ферментов (ПМО и БГЛ). Положительное влияние БГЛ на работу различных целлюлаз известно давно, и перед нами не стояла задача тщательного изучения взаимодействия этих ферментов. Интересно было подробнее исследовать влияние ПМО на разные целлобιοгидролазы и эндоглюканазы.

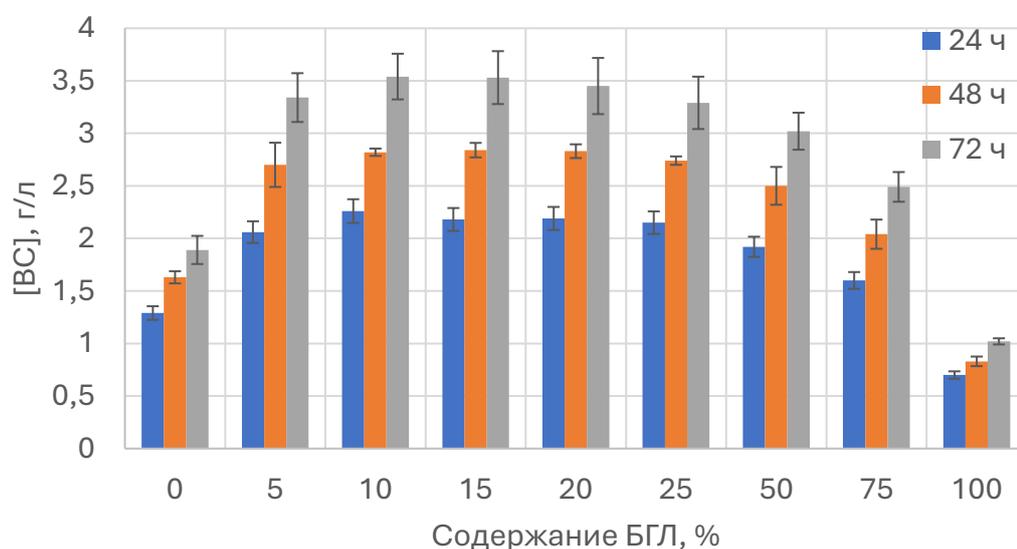
Для изучения взаимодействия БГЛ и основных целлюлаз часть последних в реакционной смеси заменяли на БГЛ в диапазоне от 5 до 25% с шагом 5%, а в диапазоне от 25 до 75% с шагом 25% при сохранении суммарной концентрации белка 1 мг/г субстрата. Гидролиз проводили при pH 5,0, 50°C. В качестве субстрата использовали МКЦ (100 г/л).

При использовании ЭГ2н как основной целлюлазы для гидролиза МКЦ эффективным оказывалась замена 10–15% фермента на БГЛ (рис. 15А). Общий выход сахаров увеличивался почти в 2 раза по сравнению с индивидуальной ЭГ2н. В свою очередь замена 10% ЦБГ1н на БГЛ привела к увеличению выхода сахаров более, чем в 2 раза (рис. 15Б).

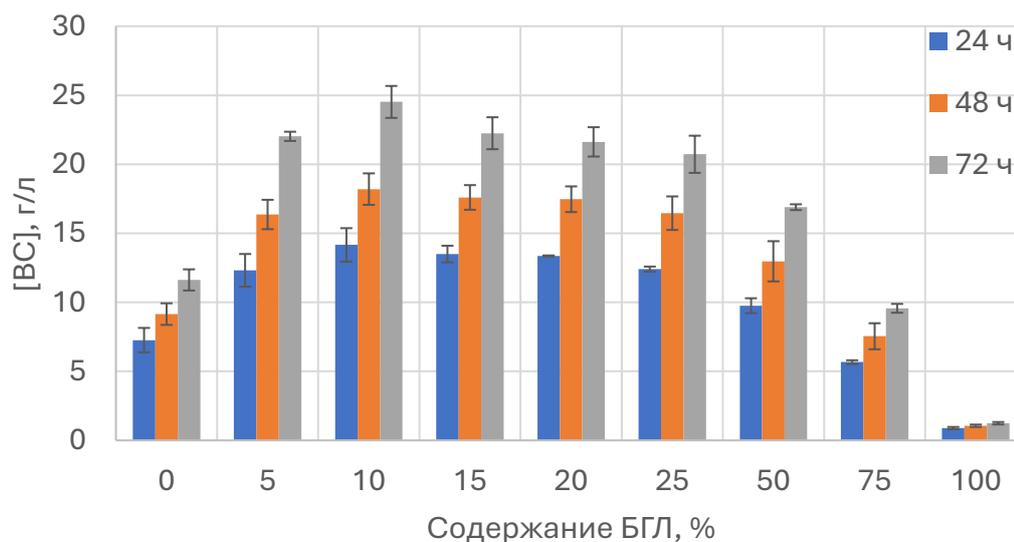
Ранее было установлено, что фермент ПМО из гриба *P.veruculosum* обладает смешанным типом действия и способен окислять как С1-, так и С4-атом глюкозидного остатка [223]. Однако было не до конца понятно влияние ПМО на различные ферменты целлюлазного комплекса. Для изучения потенциального синергетического эффекта от присутствия ПМО проводили гидролиз МКЦ под действием смеси ЦБГ1н/БГЛ в соотношении 9:1, в которой часть смеси замещали на эквивалентное количество ПМО. Содержание ПМО варьировали в диапазоне от 5 до 25% с шагом 5% при сохранении суммарной концентрации белка 1 мг/г субстрата. В качестве субстрата использовали МКЦ (100 г/л). Гидролиз проводили при pH 5,0, 50°C.

На рисунке 16А показана зависимость концентрации ВС от состава указанных смесей на основе ЦБГ1н через 1 ч после начала гидролиза МКЦ. Для большинства смесей, содержащих ПМО, наблюдалось заметное увеличение концентрации образующихся сахаров по сравнению с

таковой для ЦБГ1н/БГЛ в отсутствие ПМО, несмотря на пониженное содержание ЦБГ1н в смесях, что свидетельствует о синергизме между ферментами. Наиболее заметный эффект проявлялся при 15% ПМО: увеличение выхода ВС по сравнению с теоретическим составило 35%.



А)

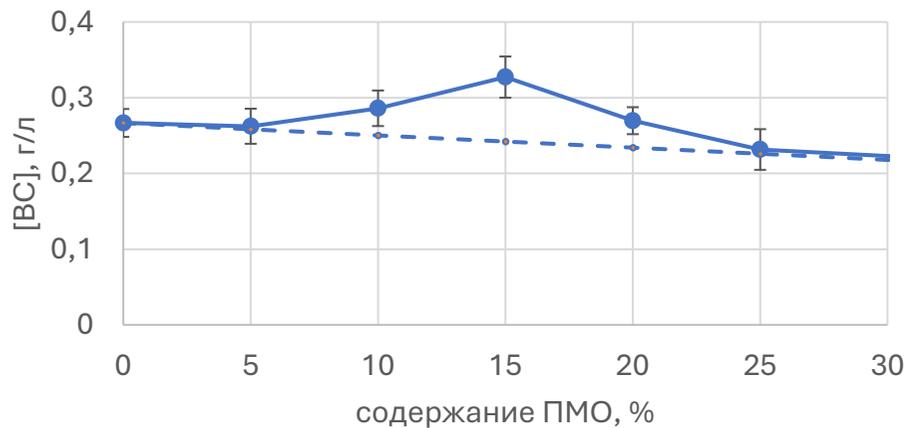


Б)

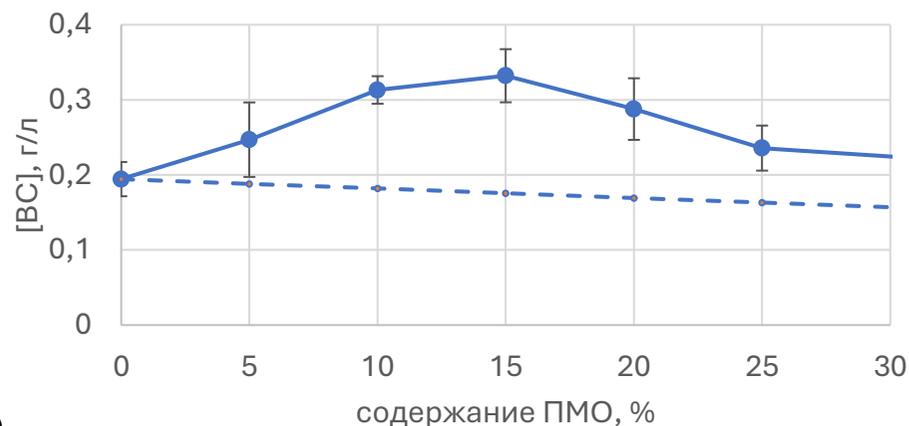
Рисунок 15. Выход ВС при гидролизе МКЦ смесями ЭГ2н/БГЛ (А) и ЦБГ1н/БГЛ (Б), pH 5,0, 50°C.

В случае смесей ЦБГ2/БГЛ с ПМО в аналогичных условиях наблюдалась схожая картина. При замещении части смеси ЦБГ2/БГЛ на ПМО через 1 час после начала гидролиза МКЦ наблюдалось увеличение выхода ВС относительно действия ЦБГ2/БГЛ без ПМО. Наибольший выход наблюдался также при 15% ПМО, а увеличение выхода ВС составило уже 88% (рис. 16Б).

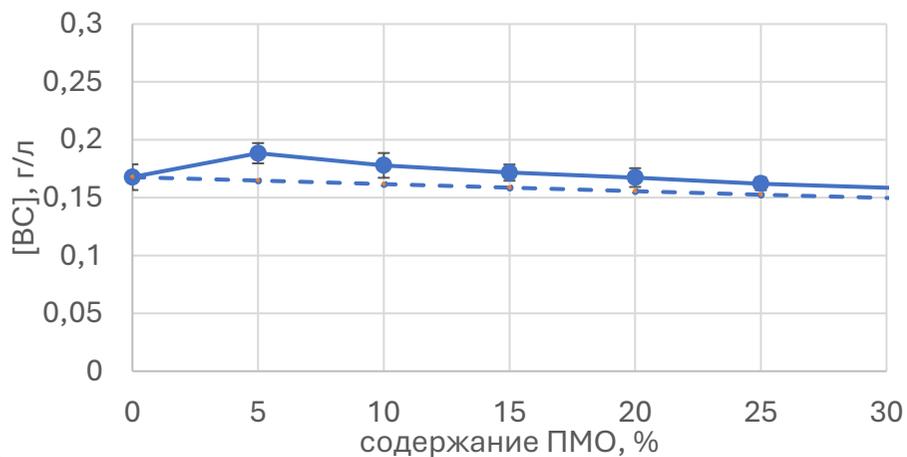
Для ЭГ1 и ЭГ2н синергетическое взаимодействие с ПМО было менее выражено: увеличение выхода ВС после 1 ч гидролиза составило 15 и 20% относительно теоретических значений (рис. 16В и 16Г).



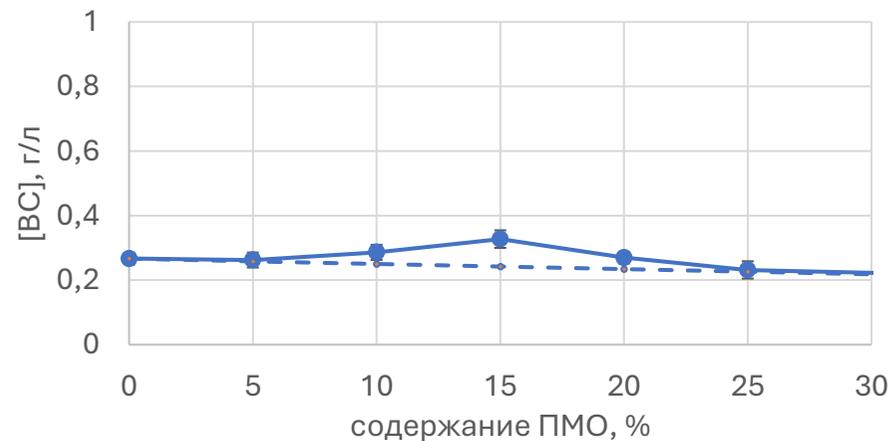
А)



Б)



В)



Г)

Рисунок 16. Выход ВС за 1 час гидролиза МКЦ смесями ЦБГ1н/БГЛ (А), ЦБГ2/БГЛ (Б) или ЭГ1 с ПМО (В) или за 1 час гидролиза АЦ смесями ЭГ2н с ПМО (Г) при рН 5,0, 50°С. Штриховая линия соединяет значения концентрации ВС, полученные при 100% основного фермента и 100% ПМО.

Таким образом, замещение 10–20% основных целлюлаз ферментного комплекса гриба *P.verruculosum* на гомологичную ПМО смешанного типа действия оказывает положительный эффект на начальную скорость гидролиза МКЦ.

Для всех смесей за 1 час гидролиза был определён коэффициент синергизма ( $K_S$ ). Он вычислялся по следующей формуле:

$$K_S = [BC]_{1+2} / (W * [BC]_1 + (1 - W) * [BC]_2),$$

где  $[BC]_{1+2}$  концентрация ВС, полученных за определенное время реакции под действием смеси ферментов,  $[BC]_1$  – концентрация ВС, полученных за то же время реакции при 0% ПМО,  $[BC]_2$  – концентрация ВС, полученных за то же время реакции при 100% ПМО,  $W$  – массовая доля основной целлюлазы в реакционной смеси, варьируемая в диапазоне от 1 до 0.

Так как ПМО *P.verruculosum* способна генерировать окисленные продукты как на восстанавливающем, так и на невосстанавливающем концах молекулы целлюлозы, то она способна оказывать эффект на работу как ЦБГ1н, так и ЦБГ2. Кроме того, воздействуя на кристаллические зоны целлюлозы и способствуя её аморфизации, ПМО может увеличивать долю субстрата, доступного для действия ЭГ1 и ЭГ2н. Наибольшее значение коэффициента синергизма после 1 ч гидролиза наблюдалось для смесей с ЦБГ2 (рис. 17). Оно варьировало от 1,3 до 1,9 в зависимости от содержания ПМО; максимальное значение фиксировалось при 15% ПМО в реакционной смеси. Для остальных целлюлаз значение коэффициента синергизма было ниже. В случае смесей с ЦБГ1н максимальное значение  $K_S$  наблюдалось при 15% ПМО в реакционной смеси и равнялось 1,4. В случае смесей с ЭГ2н максимальное значение  $K_S$  наблюдалось при 10-15% ПМО в реакционной смеси и равнялось 1,3. Для ЭГ1 максимальное значение  $K_S$  составило 1,2 при 5% ПМО.

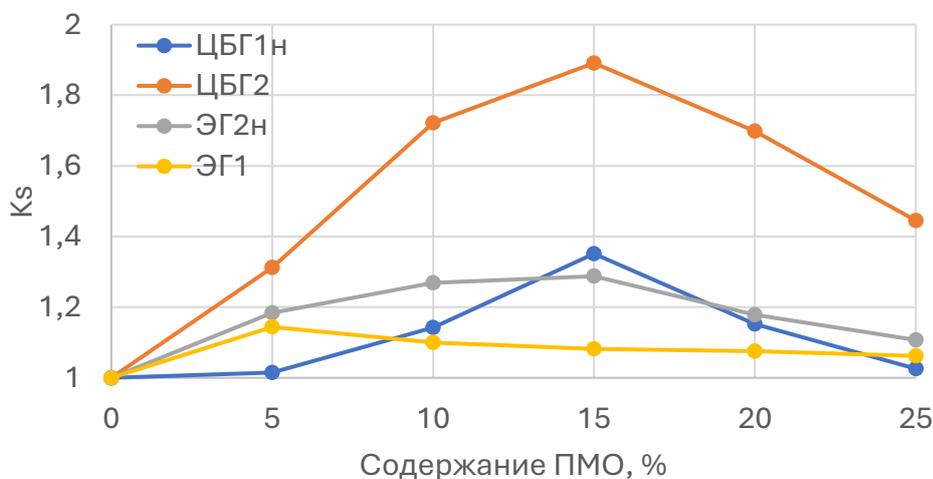


Рисунок 17. Изменение коэффициента синергизма от содержания ПМО в реакционной смеси после 1 ч гидролиза МКЦ (в случае ЦБГ1н, ЦБГ2 и ЭГ1) или АЦ (в случае ЭГ2н) при pH 5,0, 50°C.

Было проведено изучение изменения коэффициента синергизма основных целлюлаз и ПМО при длительном гидролизе (рис. 18). Во всех случаях максимальный синергетический эффект наблюдался за 1 час гидролиза, с течением времени он уменьшался, и величина  $K_s$  снижалась (после 24 ч гидролиза значение составило 1,05 для всех ферментов). Это может быть связано с накоплением большого числа окисленных продуктов действия ПМО.

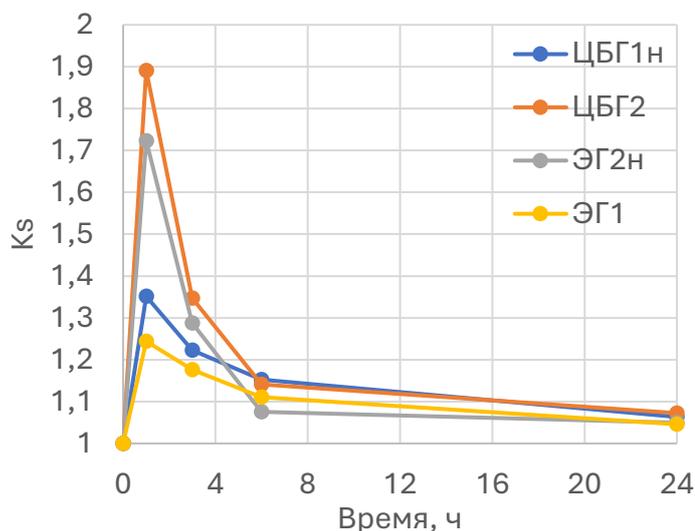
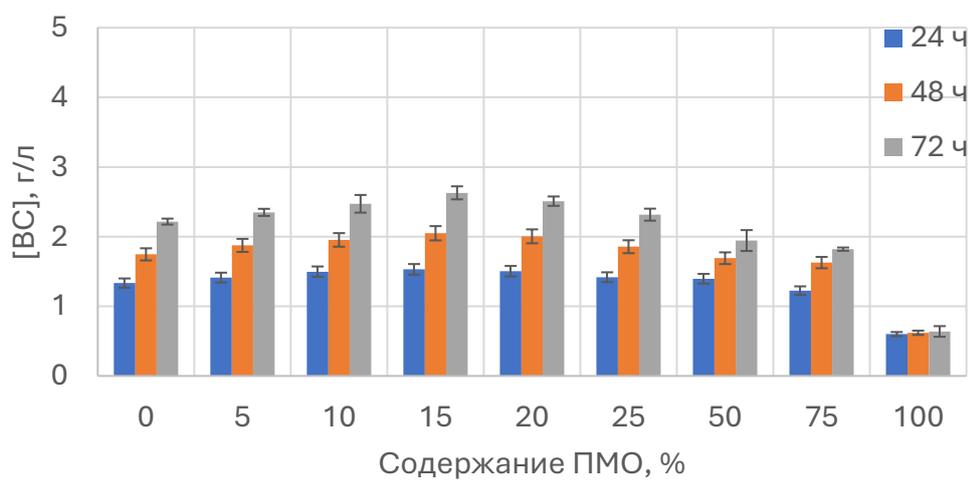


Рисунок 18. Изменение коэффициента синергизма от времени при действии основных целлюлаз и ПМО на МКЦ (в случае ЦБГ1н, ЦБГ2 и ЭГ1) или АЦ (в случае ЭГ2н) при pH 5,0, 50°C.

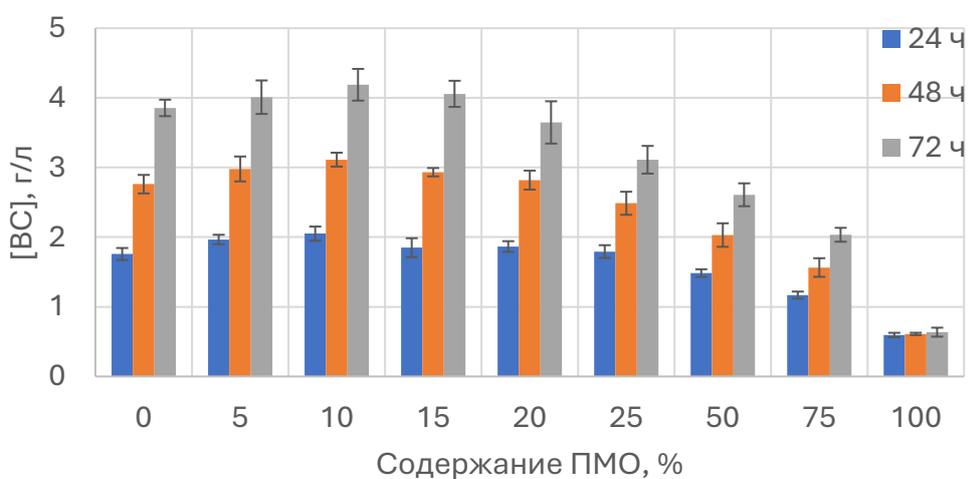
Замена части ферментов на ПМО *P.verruculosum*, обладающую смешанным типом действия, оказывало положительный эффект на общий выход сахаров при длительном гидролизе МКЦ – 72 ч. Так, для смесей ЭГ2н с 15% ПМО прирост выхода ВС относительно индивидуальной ЭГ2н составлял 9% (рис. 19А). В случае добавления ПМО к ЭГ1 наблюдался прирост выхода сахаров до 8% для смеси, 10% которой заменили на ПМО (рис. 19Б). Добавление ПМО к смеси ЦБГ1н/БГЛ приводило к увеличению выхода ВС после 72 ч гидролиза МКЦ до 9% (рис. 19В).

В целом, механизм кинетического синергизма между ПМО и ЦБГ сходен с таковым для пары ЭГ – ЦБГ, когда действие первого из ферментов увеличивает концентрацию субстрата (концов полимерной цепи) для второго фермента. Снижение синергетического эффекта с течением времени связан с накоплением окисленных концов молекулы целлюлозы и побочного продукта катализа ПМО – пероксида водорода, – являющихся ингибиторами ЦБГ.

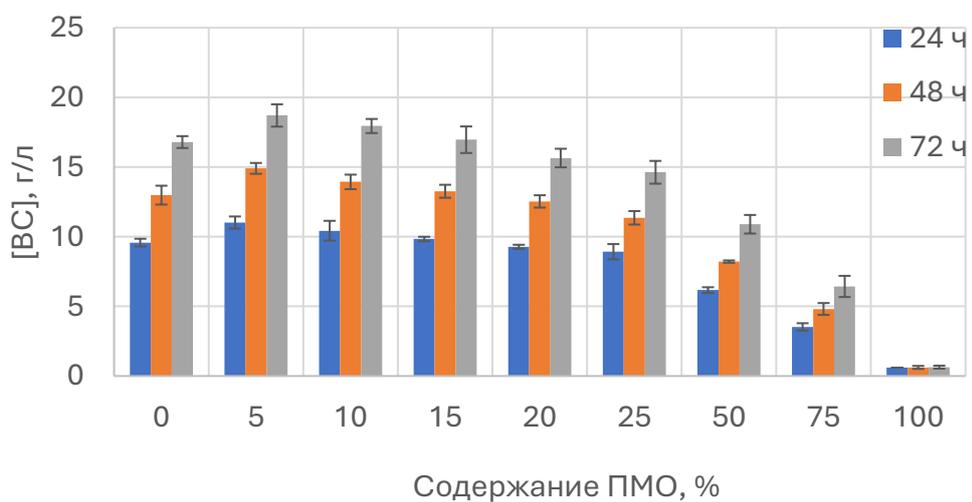
Что касается смесей, содержащих ЭГ и ПМО, то основа синергетического взаимодействия, по-видимому, заключается в нарушении упорядоченной структуры субстрата, её аморфизации и увеличении удельной площади поверхности, протекающих под действием ПМО и тем самым подготавливающих субстрат для действия ЭГ.



А)



Б)



В)

Рисунок 19. Выход ВС при длительном гидролизе МКЦ смесями ЭГ2н/ПМО (А), ЭГ1/ПМО (Б) и ЦБГ1н/БГЛ/ПМО (В).

\*\*\*

Таким образом, наблюдалось положительное влияние БГЛ на гидролитическую активность ЦБГ и ЭГ. Замена 10–15% ЦБГ1н или ЭГ2н на БГЛ при длительном гидролизе МКЦ приводило к увеличению выхода ВС в 2 раза.

ПМО смешанного типа действия проявляла синергетическое взаимодействие с очищенными ЦБГ1н, ЦБГ2, ЭГ1 и ЭГ2н, причем оно было наиболее выражено в начальный период гидролиза. Присутствие небольшого количества ПМО (10–15%) в целлюлазном комплексе, сформированным из ЦБГ, ЭГ и БГЛ, увеличивало гидролитическую способность комплекса до 9% при его воздействии на МКЦ в течение длительного времени. В целом из полученных данных можно судить о том, что основную работу ПМО совершает именно в начальный период реакции и с течением времени эффект от её присутствия в реакционной смеси снижается.

## 8. Гидролиз ЦСС смесями индивидуальных ферментов

Ранее нами была проведена оценка гидролитической способности индивидуальных ферментов, а также изучен синергетический эффект основных целлюлаз (ЦБГ1н, ЭГ1 и ЭГ2н) и вспомогательных ферментов (ПМО и БГЛ) при гидролизе МКЦ, определена оптимальная температура гидролиза для комплекса ферментов (55°C). Следующая задача заключалась в изучении поведения смеси ферментов (основных и вспомогательных) при гидролизе ЦСС. Для гидролиза использовали МКЦ, СНЛЦ, СНХЦ и ЩТ.

Ферменты смешивали в оптимальном соотношении, которое зависело от субстрата: для МКЦ и СНХЦ соотношение ЦБГ1 (исходной или мутантной), ЭГ2 (исходной или мутантной) и БГЛ составило 7:2:1 соответственно. В случае СНЛЦ и ЩТ требовалось добавление КсилЕ для более эффективного гидролиза. КсилЕ не участвует в гидролизе целлюлозы, но воздействует на ксилан, который содержится в данных субстратах в большом количестве. Соотношение ЦБГ1 (исходной или мутантной), ЭГ2 (исходной или мутантной), КсилЕ и БГЛ в данном случае составляло 6,4:1,3:1,3:1. Часть смесей вместо ЦБГ1 (исходной или мутантной) содержала комбинацию ЦБГ1 (исходной или мутантной) и ЦБГ2 в соотношении 2:1, в части смесей ЭГ2 (исходная или мутантная) была полностью заменена на ЭГ1. В качестве вспомогательных ферментов использовалась либо индивидуальная БГЛ, либо смесь БГЛ и ПМО в соотношении 1:1.

Такой широкий спектр ферментов и их сочетаний позволил одновременно оценить наиболее действенные комбинации ферментов и сравнить эффективность нативных и мутантных форм ЦБГ1 и ЭГ2 при их использовании с другими ферментами, необходимыми для осахаривания растительного сырья.

Концентрация субстрата составляла 100 г/л, а общая концентрация ферментов – 1 мг/г субстрата. Для предотвращения роста микроорганизмов в реакционные смеси добавляли антибиотик ампицилин. Гидролиз проводили в течение 96 ч при pH 5,0, 55°C и постоянном перемешивании, отбирая аликвоты через 1, 3, 24, 48, 72 и 96 ч и измеряя в них концентрацию ВС. После 96 ч гидролиза в реакционной смеси также определяли качественный и количественный состав низкомолекулярных продуктов гидролиза.

### 8.1. Гидролиз микрокристаллической целлюлозы (МКЦ)

Изменение концентрации ВС в ходе гидролиза МКЦ различными комбинациями ферментов представлено на рисунках 4.1-4.6 Приложения 2. В таблице 8 приведены значения концентрации ВС после 3 (как характеристика начального периода гидролиза) и 96 ч (как характеристика полного гидролиза).

Таблица 8. Концентрация ВС (г/л) после 3 и 96 ч гидролиза МКЦ смесями индивидуальных ферментов, рН 5,0, 55°C.

Смесь ферментов		Время гидролиза, ч	
		3	96
ЭГ2н+БГЛ	ЦБГ1н	3,0±0,1	17±1
	ЦБГ1д	3,4±0,2	19±1
	ЦБГ1н+ЦБГ2	4,0±0,3	21±1
	ЦБГ1д+ЦБГ2	4,3±0,3	23±1
ЭГ2н+БГЛ+ПМО	ЦБГ1н	3,3±0,2	17±1
	ЦБГ1д	3,7±0,2	21±2
	ЦБГ1н+ЦБГ2	4,0±0,3	23±1
	ЦБГ1д+ЦБГ2	4,3±0,2	24±2
ЭГ2д+БГЛ	ЦБГ1н	3,0±0,2	16±1
	ЦБГ1д	3,2±0,3	21±1
	ЦБГ1н+ЦБГ2	3,8±0,1	21±1
	ЦБГ1д+ЦБГ2	4,0±0,3	22±2
ЭГ2д+БГЛ+ПМО	ЦБГ1н	3,0±0,2	16±1
	ЦБГ1д	3,6±0,2	21±1
	ЦБГ1н+ЦБГ2	3,9±0,3	23±1
	ЦБГ1д+ЦБГ2	4,1±0,2	24±1
ЭГ1+БГЛ	ЦБГ1н	3,1±0,3	16±1
	ЦБГ1д	3,5±0,1	20±1
	ЦБГ1н+ЦБГ2	4,1±0,1	22±1
	ЦБГ1д+ЦБГ2	4,5±0,2	23±1
ЭГ1+БГЛ+ПМО	ЦБГ1н	3,7±0,1	17±1
	ЦБГ1д	4,0±0,3	20±1
	ЦБГ1н+ЦБГ2	4,7±0,4	23±1
	ЦБГ1д+ЦБГ2	4,8±0,3	25±1

В начальный период гидролиза МКЦ хорошо видны эффекты “быстрых” ферментов, способных действовать на кристаллические зоны целлюлозы (ЭГ1 и ПМО). Так, за 3 ч гидролиза смеси, содержащие ЭГ1, дают больший выход ВС, чем смеси с ЭГ2н и ЭГ2д: 4,5-4,8 г/л для лучших смесей с ЭГ1, против 4,0-4,3 и 3,9-4,1 г/л для идентичных смесей с ЭГ2н и ЭГ2д соответственно. Сравнивая идентичные смеси, которые содержат или ЭГ2н, или ЭГ2д, заметно

небольшое преимущество исходной формы фермента, но в большинстве случаев оно не превышает 5%.

Присутствие ПМО как вспомогательного фермента за 3 ч гидролиза приводило к росту концентрации ВС на 5–27% относительно действия смесей, содержащих только БГЛ в качестве вспомогательного фермента. Максимальные концентрации ВС для смесей, в которых присутствовала ПМО, составляли 4,7-4,8 г/л (смесь ЭГ1+ЦБГ1д или ЦБГн+ЦБГ2), а для аналогичных смесей без ПМО – 4,1-4,5 г/л.

Среди целлюбиогидролаз мутантная форма ЦБГ1д показала себя лучше, чем нативная ЦБГ1н. В зависимости от природы ЭГ и вспомогательных ферментов выход ВС после 3 ч гидролиза смесями с ЦБГ1д был на 7–20% выше по сравнению со смесями с ЦБГ1н. Наибольший выход ВС за 3 ч гидролиза наблюдался для смесей ЦБГ1д с ЭГ1 и БГЛ или БГЛ+ПМО и составлял 3,5-4,0 г/л, а в случае аналогичных смесей с ЦБГ1н – 3,1-3,7 г/л.

Замена части ЦБГ1 (исходной или мутантной) на ЦБГ2 положительно сказывалось на выходе ВС для всех смесей: прирост выхода сахаров после 3 ч гидролиза составлял 16-33% относительно смесей, содержащих только ЦБГ1н или ЦБГ1д.

При длительном гидролизе МКЦ в течение 96 ч разница между действием той или иной эндоглюканазы нивелировалась, сохранялось небольшое преимущество у смесей, содержащих БГЛ и ПМО, относительно смесей, в которых в качестве вспомогательного фермента присутствовала только БГЛ. Наиболее существенной была разница в действии смесей, содержащих целлюбиогидролазы разной природы: преимущество мутантной формы ЦБГ1д перед исходной ЦБГ1н проявлялось в увеличении выхода ВС за 96 ч гидролиза на 17-31% (максимальная концентрация ВС 21 г/л), а использование смеси ЦБГ1д и ЦБГ2 приводило к высвобождению на 4-10% больше сахаров (23-25 г/л).

На рисунке 20 представлена поверхностная диаграмма, характеризующая выход сахаров после 96 ч гидролиза МКЦ для разных смесей ферментов. Зеленая зона соответствует наибольшей концентрации ВС 20-25 г/л, желтая – диапазону 15-20 г/л. Левая часть диаграммы соответствует смесям основных целлюлаз только с БГЛ, правая – с БГЛ и ПМО. По форме и цветовому распределению диаграммы видно, что наибольшие значения выхода ВС концентрируются в областях, соответствующих смесям с ЦБГ1д и ЦБГ2 вне зависимости от природы ЭГ с небольшим предпочтением присутствия обоих вспомогательных ферментов.

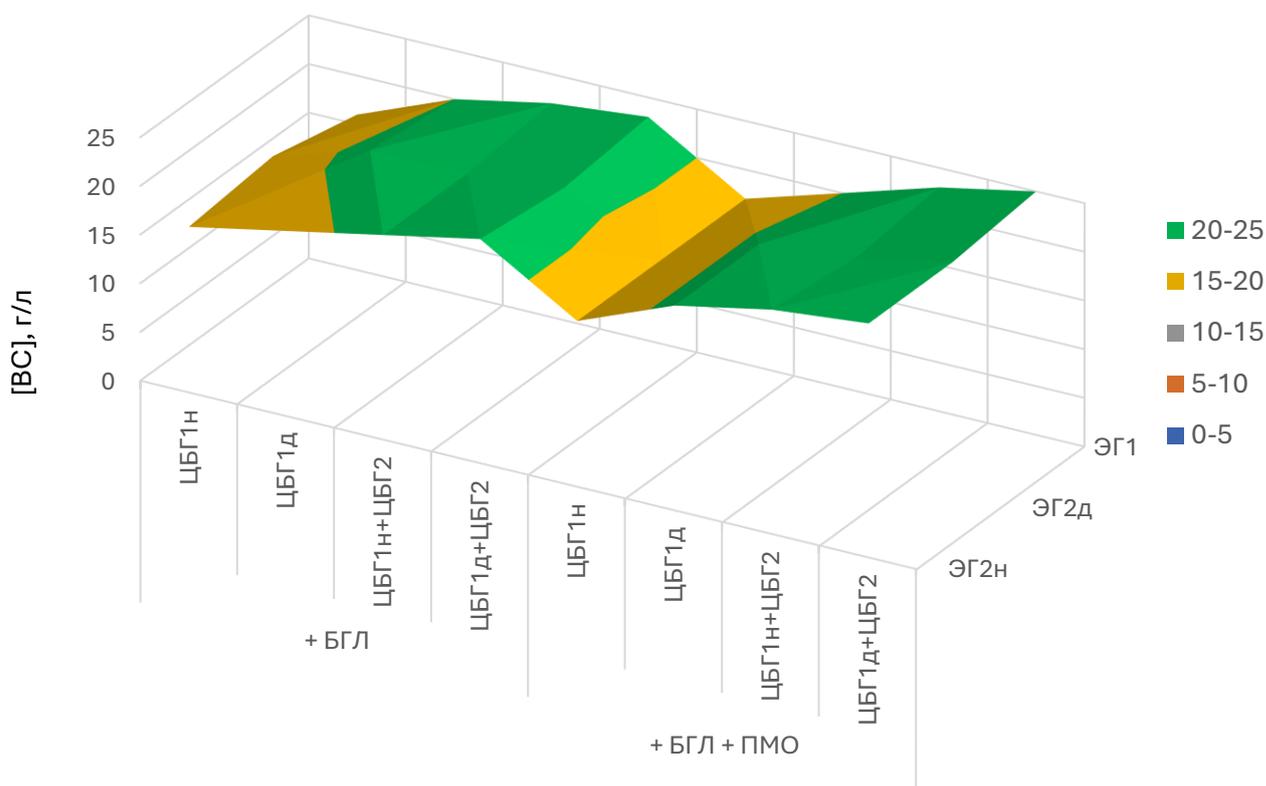


Рисунок 20. Поверхностная диаграмма распределения концентрации ВС после 96 ч гидролиза МКЦ (100 г/л) в зависимости от состава ферментов в смеси (суммарная концентрация 1 мг/г субстрата) при pH 5,0, 55°C.

## 8.2. Гидролиз сульфатной небеленой лиственной целлюлозы (СНЛЦ)

При гидролизе СНЛЦ во всех смесях присутствовала КсилЕ для гидролиза содержащихся в субстрате ксиланов. Изменение концентрации ВС в ходе гидролиза СНЛЦ различными комбинациями ферментов представлено на рисунках 5.1-5.6 Приложения 2. В таблице 9 приведены значения концентрации ВС после 3 (как характеристика начального периода гидролиза) и 96 ч (как характеристика полного гидролиза), а также концентрации основных низкомолекулярных продуктов, накопленных к 96 ч гидролиза.

В начальный период гидролиза СНЛЦ разницы между действием эндоглюканаз разной природы не наблюдалось, что говорит о достаточной аморфизации целлюлозы в ходе предобработки лиственной древесины, а гидролитическая способность ЭГ2н, ЭГ2д и ЭГ1 по отношению к аморфной, не кристаллической целлюлозе была близкой. Те же выводы можно сделать при анализе результатов длительного гидролиза: разницы между действием смесей, содержащих разные эндоглюканы, не было.

Присутствие ПМО как вспомогательного фермента не всегда приводило к росту концентрации ВС относительно действия смесей, содержащих только БГЛ в качестве вспомогательного фермента как в начальный период гидролиза (после 3 ч), так и в последующий.

Возможно, это связано с достаточно сильным экранированием целлюлозы ксиланами. Тем более, что глубина конверсии СНЛЦ была в целом ниже, чем глубина конверсии МКЦ вне зависимости от состава ферментов.

Таблица 9. Концентрация (г/л) ВС и низкомолекулярных продуктов гидролиза СНЛЦ смесями индивидуальных ферментов, рН 5,0, 55°C.

Смесь ферментов		Время гидролиза, ч			
		3	96		
		ВС	ВС	ксилоза	глюкоза
ЭГ2н+КсилЕ+БГЛ	ЦБГ1н	3,0±0,3	13±1	1,8±0,1	8,1±0,4
	ЦБГ1д	3,1±0,2	15±1	4,4±0,2	8,3±0,4
	ЦБГ1н+ЦБГ2	2,9±0,3	16±1	1,9±0,1	9,7±0,4
	ЦБГ1д+ЦБГ2	3,4±0,1	17±1	3,6±0,2	11±0,5
ЭГ2н+КсилЕ+БГЛ+ПМО	ЦБГ1н	2,8±0,1	15±1	4,2±0,2	8,7±0,4
	ЦБГ1д	3,0±0,2	17±1	4,0±0,2	11±0,5
	ЦБГ1н+ЦБГ2	3,1±0,1	18±1	2,3±0,1	11±0,5
	ЦБГ1д+ЦБГ2	3,3±0,1	19±1	2,8±0,1	11±0,5
ЭГ2д+КсилЕ+БГЛ	ЦБГ1н	3,3±0,2	15±1	4,0±0,2	6,7±0,3
	ЦБГ1д	3,4±0,2	16±1	4,1±0,2	8,7±0,4
	ЦБГ1н+ЦБГ2	3,4±0,2	17±1	4,2±0,2	8,9±0,4
	ЦБГ1д+ЦБГ2	3,6±0,1	18±1	5,3±0,2	9,4±0,5
ЭГ2д+КсилЕ+БГЛ+ПМО	ЦБГ1н	3,3±0,3	14±1	3,7±0,1	8,6±0,4
	ЦБГ1д	3,8±0,3	16±1	4,5±0,2	9,5±0,5
	ЦБГ1н+ЦБГ2	3,6±0,3	17±2	4,3±0,2	12±0,6
	ЦБГ1д+ЦБГ2	4,1±0,3	19±1	3,0±0,1	12±0,6
ЭГ1+КсилЕ +БГЛ	ЦБГ1н	3,3±0,2	15±1	1,5±0,1	9,9±0,5
	ЦБГ1д	3,4±0,1	17±1	1,7±0,1	10±0,5
	ЦБГ1н+ЦБГ2	3,3±0,1	19±1	2,2±0,1	10±0,5
	ЦБГ1д+ЦБГ2	3,7±0,3	20±1	2,3±0,1	11±0,6
ЭГ1+КсилЕ+БГЛ+ПМО	ЦБГ1н	3,2±0,1	16±1	1,8±0,1	9,9±0,5
	ЦБГ1д	3,7±0,2	18±1	4,4±0,2	10±0,5
	ЦБГ1н+ЦБГ2	3,5±0,2	19±1	1,9±0,1	11±0,5
	ЦБГ1д+ЦБГ2	4,2±0,2	21±1	3,6±0,2	13±0,6

В случае использования разных целлюбиогидролаз отличие в выходе сахаров наблюдалось как в начальный период гидролиза СНЛЦ, так и в конце: мутантная форма ЦБГ1д была эффективнее исходной ЦБГ1н на 3-15%, а замена части ЦБГ1д на ЦБГ2 приводила к увеличению выхода сахаров на 9-20% на любом этапе гидролиза. Наибольший выход ВС за 3 ч гидролиза составлял около 4 г/л, после 96 ч – около 20 г/л и соответствовал смесям, содержащим одновременно ЦБГ1д и ЦБГ2.

Среди низкомолекулярных продуктов гидролиза были обнаружены глюкоза и ксилоза, при этом выход глюкозы хорошо коррелировал с выходом ВС. Для лучших смесей с наибольшим выходом ВС наблюдалось накопление 11-13 г/л глюкозы и 2-4 г/л ксилозы.

На рисунке 21 представлена поверхностная диаграмма, характеризующая выход сахаров после 96 ч гидролиза СНЛЦ для разных смесей ферментов. Зеленая зона соответствует наибольшей концентрации ВС 20-25 г/л, желтая – диапазону 15-20 г/л, серая – 10-15 г/л. Левая часть диаграммы соответствует смесям основных целлюлаз только с БГЛ, правая – с БГЛ и ПМО. По форме и цветовому распределению диаграммы видно, что наибольшие значения выхода ВС концентрируются в области, соответствующей смеси ЦБГ1д+ЦБГ2+ЭГ1+БГЛ+ПМО.

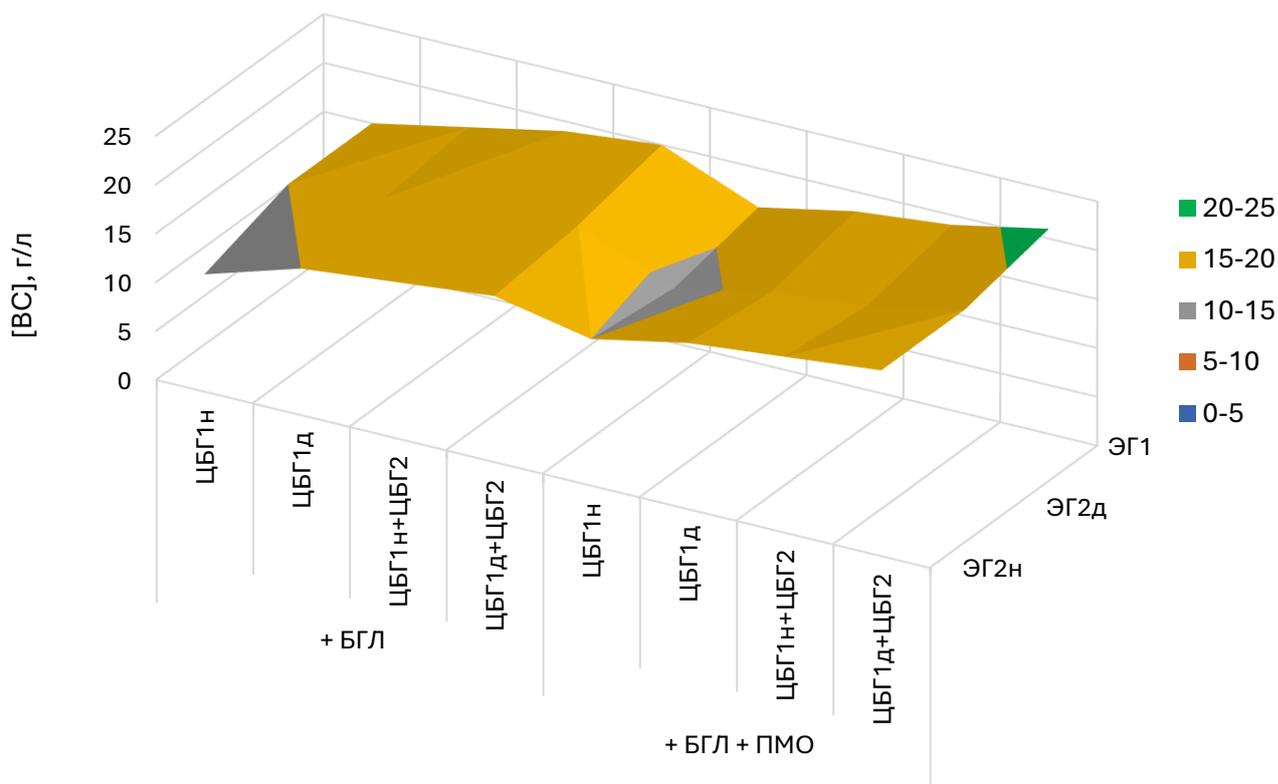


Рисунок 21. Поверхностная диаграмма распределения концентрации ВС после 96 ч гидролиза СНЛЦ (100 г/л) в зависимости от состава ферментов в смеси (суммарная концентрация 1 мг/г субстрата) при pH 5,0, 55°C.

### 8.3. Гидролиз сульфатной небеленой хвойной целлюлозы (СНХЦ)

Гидролиз СНХЦ протекал наиболее интенсивно по сравнению с гидролизом других субстратов. Изменение концентрации ВС в ходе гидролиза СНХЦ различными комбинациями ферментов представлено на рисунках 6.1-6.6 Приложения 2. В таблице 10 приведены значения концентрации ВС после 3 (как характеристика начального периода гидролиза) и 96 ч (как характеристика полного гидролиза), а также концентрации основных низкомолекулярных продуктов, накопленных к 96 ч гидролиза.

В начальный период гидролиза СНХЦ, как и в случае гидролиза МКЦ, наблюдалась разница в действии эндо-деполимераз. В отсутствие ПМО преимуществом обладали смеси, содержащие ЭГ2д: выход ВС был на 7-21 и 3-10% выше, чем в случае смесей с ЭГ2н или ЭГ1 соответственно. Если в качестве вспомогательных ферментов использовали одновременно БГЛ и ПМО, преимуществом обладали смеси, содержащие ЭГ1: выход ВС был на 16-28 и 9-20% выше, чем в случае смесей с ЭГ2н или ЭГ2д соответственно. Таким образом в начале гидролиза СНХЦ синергетический эффект между ПМО и ЭГ1 оказался выше, чем между ПМО и ЭГ2д. При длительном гидролизе (после 96 ч) разница между действием смесей, содержащих ЭГ1 или ЭГ2д, нивелировалась, концентрация ВС составила 21-30 г/л в зависимости от состава целлобиогидролаз и вспомогательных ферментов, а преимущество перед использованием ЭГ2н составило 8-40% (15-25 г/л).

Присутствие ПМО как вспомогательного фермента как правило приводило к росту концентрации ВС относительно действия смесей, содержащих только БГЛ в качестве вспомогательного фермента как в начальный период гидролиза (после 3 ч), так и в последующий. Прирост выхода ВС составлял до 10%.

В случае использования разных целлобиогидролаз разница наблюдалась как в начальный период гидролиза СНХЦ, так и в конце: мутантная форма ЦБГ1д была эффективнее исходной ЦБГ1н на 9-27%, а замена части ЦБГ1д на ЦБГ2 приводила к увеличению выхода сахаров на 13-26% после 96 ч гидролиза. Наибольший выход ВС после 96 ч составлял 30 г/л и соответствовал смеси, содержащей ЦБГ1д и ЦБГ2.

Среди низкомолекулярных продуктов гидролиза были обнаружены глюкоза и ксилоза, при этом выход глюкозы хорошо коррелировал с выходом ВС, и её доля составляла от 50 до 78% от всей сахаров. Для лучшей смеси с наибольшим выходом ВС наблюдалось накопление 21 г/л глюкозы. Концентрация ксилозы была значительно ниже, чем при гидролизе СНЛЦ, и составляла около 1 г/л.

На рисунке 22 представлена поверхностная диаграмма, характеризующая выход сахаров после 96 ч гидролиза СНХЦ для разных смесей ферментов. Фиолетовая зона соответствует наибольшей концентрации ВС 25-30 г/л, зеленая – диапазону 20-25 г/л, желтая – 15-20 г/л, серая

– 10-15 г/л. По форме и цветовому распределению диаграммы видно, что наибольшие значения выхода ВС концентрируются в областях, соответствующих смесям, содержащим одновременно ЦБГ1 (нативную или мутантную) и ЦБГ2, ЭГ1 или ЭГ2д в качестве эндо-деполимеразы с небольшим предпочтением присутствия обоих вспомогательных ферментов.

Таблица 10. Концентрация (г/л) ВС и низкомолекулярных продуктов гидролиза СНХЦ смесями индивидуальных ферментов, рН 5,0, 55°C.

Смесь ферментов		Время гидролиза, ч			
		3	96		
		ВС	ВС	ксилоза	глюкоза
ЭГ2н+БГЛ	ЦБГ1н	3,8±0,1	15±1	0,8±0,1	9,1±0,5
	ЦБГ1д	4,4±0,1	19±1	1,2±0,1	11±1
	ЦБГ1н+ЦБГ2	5,0±0,1	23±2	0,6±0,1	14±1
	ЦБГ1д+ЦБГ2	5,6±0,1	24±2	0,6±0,1	14±1
ЭГ2н+ БГЛ+ПМО	ЦБГ1н	4,3±0,1	17±1	0,9±0,1	11±1
	ЦБГ1д	4,5±0,1	21±1	1,1±0,1	13±1
	ЦБГ1н+ЦБГ2	4,7±0,2	23±1	0,6±0,1	14±1
	ЦБГ1д+ЦБГ2	5,1±0,1	25±2	0,7±0,1	14±1
ЭГ2д+БГЛ	ЦБГ1н	4,6±0,1	21±1	1,1±0,1	12±1
	ЦБГ1д	4,8±0,1	23±1	0,6±0,1	12±1
	ЦБГ1н+ЦБГ2	5,4±0,4	25±1	0,8±0,1	12±1
	ЦБГ1д+ЦБГ2	6,0±0,2	26±1	0,8±0,1	13±1
ЭГ2д+БГЛ+ПМО	ЦБГ1н	4,6±0,1	23±1	0,6±0,1	11±1
	ЦБГ1д	4,6±0,2	26±2	0,6±0,1	12±1
	ЦБГ1н+ЦБГ2	5,1±0,1	27±1	0,6±0,1	15±1
	ЦБГ1д+ЦБГ2	5,4±0,3	28±1	0,6±0,1	16±1
ЭГ1+БГЛ	ЦБГ1н	4,2±0,2	21±1	0,6±0,1	13±1
	ЦБГ1д	4,6±0,2	23±1	0,6±0,1	15±1
	ЦБГ1н+ЦБГ2	5,2±0,3	26±2	0,6±0,1	17±1
	ЦБГ1д+ЦБГ2	5,8±0,4	28±1	0,6±0,1	18±1
ЭГ1+ БГЛ+ПМО	ЦБГ1н	5,3±0,4	23±1	0,7±0,1	13±1
	ЦБГ1д	5,5±0,9	25±2	0,6±0,1	19±1
	ЦБГ1н+ЦБГ2	5,7±0,5	27±2	0,6±0,1	20±1
	ЦБГ1д+ЦБГ2	5,9±0,4	30±2	0,8±0,1	21±1

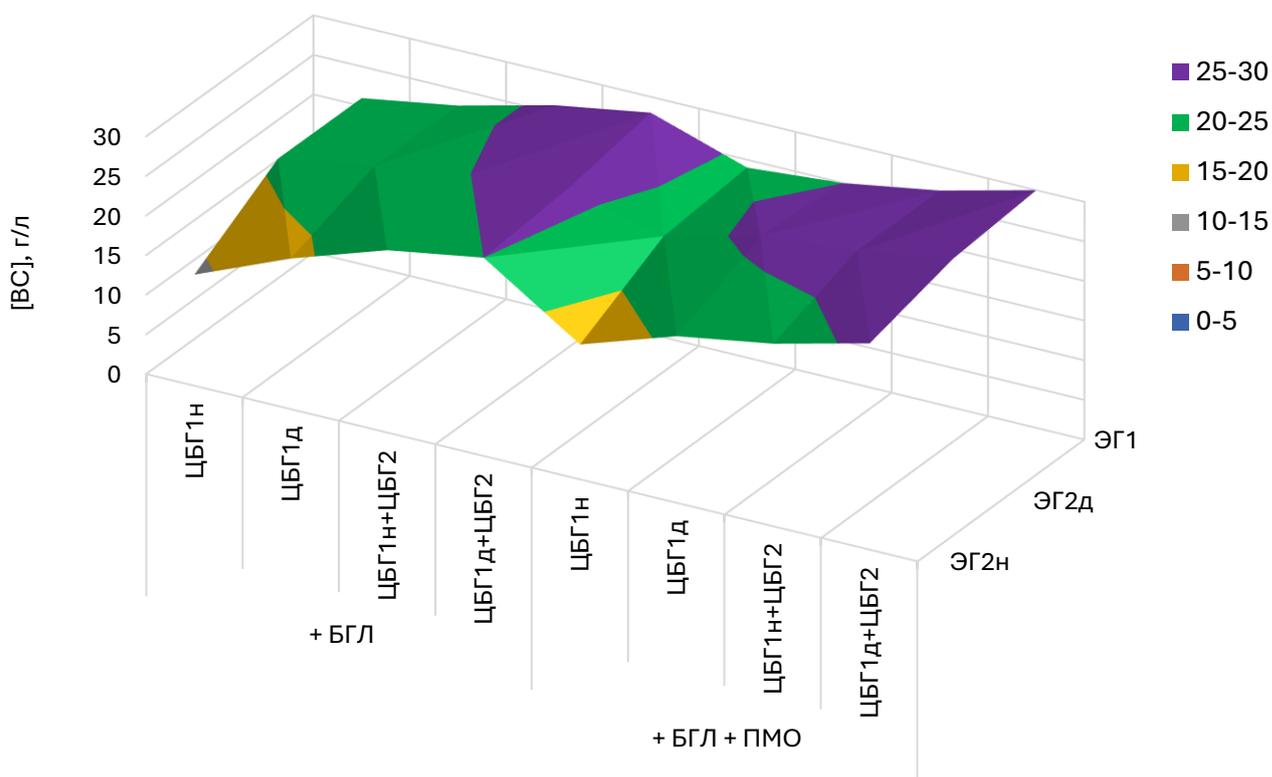


Рисунок 22. Поверхностная диаграмма распределения концентрации ВС после 96 ч гидролиза СНХЦ (100 г/л) в зависимости от состава ферментов в смеси (суммарная концентрация 1 мг/г субстрата) при рН 5,0, 55°C.

#### 8.4. Гидролиз тростника, предобработанного щелочью (ЩТ)

При гидролизе ЩТ во всех смесях присутствовала КсилЕ для гидролиза содержащихся в субстрате ксиланов. Изменение концентрации ВС в ходе гидролиза различными комбинациями ферментов представлено на рисунках 7.1-7.6 Приложения 2. В таблице 11 приведены значения концентрации ВС после 3 (как характеристика начального периода гидролиза) и 96 ч (как характеристика полного гидролиза), а также концентрации основных низкомолекулярных продуктов, накопленных к 96 ч гидролиза.

В начальный период гидролиза ЩТ разница между действием эндоглюканаз разной природы была незначительной с небольшим предпочтением использования ЭГ2д или ЭГ1. После 96 ч гидролиза разница была заметнее, и выход ВС в случае смесей с ЭГ2д или ЭГ1 был на 23-55% выше, чем при использовании ЭГ2н (15-21 против 11-14 г/л соответственно).

Разницы между использованием только БГЛ или смеси БГЛ с ПМО в качестве вспомогательных ферментов не наблюдалось на любом этапе гидролиза.

В случае использования разных целлюбогидролаз разница наблюдалась как в начальный период гидролиза ЩТ, так и в конце: мутантная форма ЦБГ1д была эффективнее исходной ЦБГ1н на 8-27%, а замена части ЦБГ1д на ЦБГ2 приводила к увеличению выхода сахаров на 7-

27% на любом этапе гидролиза. Наибольший выход ВС за 3 ч гидролиза составлял около 7 г/л, после 96 ч – около 20 г/л и соответствовал смесям, содержащим одновременно ЦБГ1д и ЦБГ2.

Таблица 11. Концентрация (г/л) ВС и низкомолекулярных продуктов гидролиза ЩТ смесями индивидуальных ферментов, рН 5,0, 55°C.

Смесь ферментов		Время гидролиза, ч				
		3	96			
		ВС	ВС	ксилоза	арабиноза	глюкоза
ЭГ2н+КсилЕ+БГЛ	ЦБГ1н	4,5±0,4	11±1	2,1±0,1	1,3±0,1	7,0±0,3
	ЦБГ1д	5,7±0,1	13±1	2,3±0,1	1,7±0,1	7,1±0,3
	ЦБГ1н+ЦБГ2	6,1±0,2	13±1	2,4±0,1	1,4±0,1	9,1±0,4
	ЦБГ1д+ЦБГ2	6,1±0,1	14±1	2,1±0,1	1,8±0,1	10,0±0,5
ЭГ2н+КсилЕ+БГЛ +ПМО	ЦБГ1н	4,3±0,2	11±1	2,3±0,1	1,3±0,1	7,4±0,3
	ЦБГ1д	5,2±0,1	14±1	2,4±0,1	1,3±0,1	7,9±0,3
	ЦБГ1н+ЦБГ2	5,6±0,3	13±1	2,1±0,1	1,6±0,1	9,3±0,5
	ЦБГ1д+ЦБГ2	5,9±0,4	14±1	2,2±0,1	1,4±0,1	10,1±0,5
ЭГ2д+КсилЕ+БГЛ	ЦБГ1н	4,3±0,1	15±1	2,4±0,1	0,9±0,1	6,6±0,3
	ЦБГ1д	5,2±0,2	18±1	2,6±0,1	1,3±0,1	7,4±0,3
	ЦБГ1н+ЦБГ2	5,7±0,1	16±1	2,3±0,1	1,7±0,1	11,2±0,5
	ЦБГ1д+ЦБГ2	6,6±0,4	19±1	3,0±0,1	1,6±0,1	11,3±0,5
ЭГ2д+КсилЕ+БГЛ +ПМО	ЦБГ1н	5,0±0,3	16±1	2,2±0,1	0,7±0,1	6,2±0,3
	ЦБГ1д	5,5±0,1	19±2	2,3±0,1	1,3±0,1	6,6±0,3
	ЦБГ1н+ЦБГ2	5,8±0,3	18±1	2,4±0,1	1,1±0,1	9,1±0,4
	ЦБГ1д+ЦБГ2	6,7±0,5	20±1	2,2±0,1	1,2±0,1	9,7±0,4
ЭГ1+КсилЕ +БГЛ	ЦБГ1н	4,4±0,3	16±1	2,2±0,1	0,7±0,1	6,7±0,2
	ЦБГ1д	5,6±0,2	18±1	2,7±0,1	1,1±0,1	10,2±0,5
	ЦБГ1н+ЦБГ2	5,9±0,5	17±1	2,5±0,1	0,6±0,1	8,7±0,3
	ЦБГ1д+ЦБГ2	6,9±0,2	20±1	2,7±0,1	0,6±0,1	13,1±0,5
ЭГ1+КсилЕ+БГЛ +ПМО	ЦБГ1н	5,3±0,3	17±1	3,5±0,1	1,1±0,1	7,8±0,4
	ЦБГ1д	5,7±0,4	19±1	2,8±0,1	0,6±0,1	12,2±0,7
	ЦБГ1н+ЦБГ2	5,9±0,3	18±1	2,0±0,1	0,6±0,1	11,2±0,5
	ЦБГ1д+ЦБГ2	7,0±0,3	21±1	2,8±0,1	0,6±0,1	13,4±0,6

Среди низкомолекулярных продуктов гидролиза были обнаружены глюкоза, ксилоза и арабиноза, при этом выход глюкозы хорошо коррелировал с выходом ВС. Выход глюкозы был больше при использовании смесей ЦБГ1 (нативной или мутантной) и ЦБГ2 по сравнению с действием только ЦБГ1 (нативной или мутантной), и его максимальное значение составляло 13 г/л. Концентрация ксилозы после 96 ч гидролиза составляла 2,0-3,5 г/л, арабинозы – до 1,8 г/л. Корреляции между выходом ксилозы и арабинозы и составом смеси не было.

В целом закономерности гидролиза ЩТ были теми же, что и при гидролизе СНЛЦ: минимальное влияние природы эндоглюканызы и присутствия ПМО на выход ВС как в начальный период, так и при глубоком гидролизе.

На рисунке 23 представлена поверхностная диаграмма, характеризующая выход сахаров после 96 ч гидролиза ЩТ для разных смесей ферментов. Зеленая зона соответствует наибольшей концентрации ВС 20-25 г/л, желтая – диапазону 15-20 г/л, серая – 10-15 г/л. По форме и цветовому распределению диаграммы видно, что наибольшее значение выхода ВС концентрируется в области, соответствующей смеси ЦБГ1д+ЦБГ2+ЭГ1+БГЛ+ПМО.

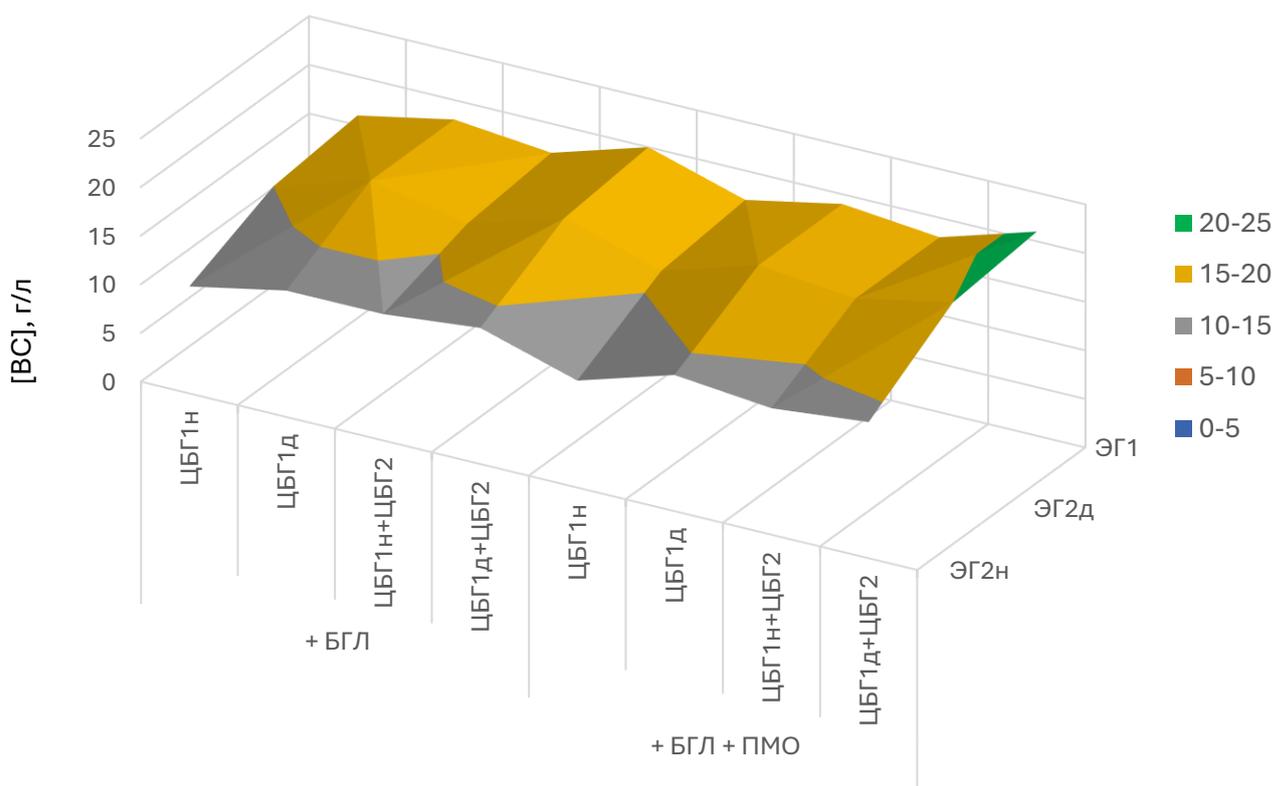


Рисунок 23. Поверхностная диаграмма распределения концентрации ВС после 96 ч гидролиза ЩТ (100 г/л) в зависимости от состава ферментов в смеси (суммарная концентрация 1 мг/г субстрата) при pH 5,0, 55°C.

\*\*\*

Таким образом необходимыми для эффективного осахаривания разного вида ЦСС являются ферменты ЦБГ1д, ЦБГ2, ЭГ2д, ЭГ1, БГЛ и ПМО. Присутствие в реакционной смеси ЭГ2д, ЭГ1 и ПМО давало преимущество в начальный период (эффект “быстрых” ферментов), особенно ярко выраженное при гидролизе МКЦ и СНХЦ. Действие смесей, содержащих ЦБГ1д и ЦБГ2, приводило к более глубокому гидролизу всех используемых субстратов по сравнению со смесями с ЦБГ1н.

Базовый комплекс препаратов целлюлаз на основе штаммов гриба *P.verruculosum* включает до 60% от общего пула ферментов ЦБГ (в соотношении ЦБГ1н:ЦБГ2 2:1), около 10% ЭГ (в основном ЭГ2н) и около 3% эндоксиланаз. Таким образом заменой ЦБГ1н на ЦБГ1д, ЭГ2н на ЭГ2д и добавлением ЭГ1 в базовый комплекс, продуцируемый грибом *P.verruculosum*, можно создать оптимальный ферментный препарат для гидролиза ЦСС в условиях его использования совместно с источником вспомогательных ферментов, состоящим из БГЛ и ПМО. Содержание ксиланаз в препаратах *P.verruculosum* постулируется достаточным.

## 9. Получение и свойства новых ФП, содержащих дегликозилированные формы ЦБГ1д и ЭГ2д и гетерологичную ЭГ1

В предыдущих разделах была продемонстрирована целесообразность использования для биоконверсии ЦСС дегликозилированных форм ЦБГ1д и ЭГ2д *P.verruculosum*, а также ЭГ1 *T.reesei*. Исследования проводились с рекомбинантными ферментами, гены которых были экспрессированы в штамме-хозяине *P.canescens*, который не продуцирует собственных целлюлаз, что облегчало выделение ЦБГ1д и ЭГ2д в индивидуальном виде. Однако штаммы *P.canescens* не обладают высокой продуктивностью и не могут быть использованы в качестве источника целлюлолитических ферментов. Поэтому необходимо было создать продуценты ЦБГ1д, ЭГ2д и ЭГ1, используя экспрессионную платформу *P.verruculosum* В1-537, характеризующуюся существенно более высокой продуктивностью, чем платформа *P.canescens*.

В промышленности довольно редко используются гомогенные ферменты в чистом виде из-за экономической нецелесообразности такого подхода. Чаще всего применяются ФП, в которых соотношение необходимых ферментов оптимально или близко к оптимальному. Для следующего этапа работы было необходимо получить препараты, содержащие интересующие нас ферменты. Для этого были созданы новые генетические конструкции (плазмиды), содержащие в себе гены *cbh1<sup>dg</sup>*, *egl2<sup>dg</sup>* и *egl1*, кодирующие ЦБГ1д, ЭГ2д и ЭГ1 *T.reesei* соответственно. Были получены несколько серий конструкций, которые содержали только ген *cbh1<sup>dg</sup>*, только ген *egl2<sup>dg</sup>*, одновременно гены *cbh1<sup>dg</sup>* и *egl2<sup>dg</sup>*, одновременно гены *cbh1<sup>dg</sup>* и *egl1* и одновременно гены *egl2<sup>dg</sup>* и *egl1*. Поскольку исходный штамм-реципиент имеет в своём составе собственные ксиланазы и, как видно из таблицы 5 раздела 5.2, ЦБГ1 и ЭГ1 способны гидролизовать ксилан, перед нами не стояла задача получить препараты с увеличенным содержанием ксиланаз. Для полученных конструкций сотрудниками лаборатории биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН был проведён ПЦР-скрининг трансформантов на наличие генов данных ферментов. Клоны были культивированы в колбах на среде для *P.verruculosum* при 32°C в течение 144 ч. Затем КЖ были отделены от мицелия и переданы нам для проведения дальнейших исследований.

### 9.1. Скрининг КЖ рекомбинантных штаммов

Для определения наиболее активных клонов был проведён скрининг полученных КЖ трансформантов. Скрининг клонов, несущих ген *egl2<sup>dg</sup>*, проводился по данным ПААГ-электрофореза (рис. 8.1 Приложения 3) и уровню активности по отношению к КМЦ (табл. 12). Так как собственной ЭГ2н в исходном штамме-реципиенте немного (3–5% от общего пула белков), увеличение содержания ЭГ2д в КЖ хорошо заметно.

Таблица 12. Концентрация белка (мг/мл) и активность к КМЦ в КЖ клонов, несущих ген *egl2<sup>dg</sup>*.

Клоны	Концентрация белка	Активность	
		абсолютная (ед/мл)	удельная (ед/мг)
B3	4,5±0,2	9,5±0,4	2,1±0,1
B4	4,9±0,3	8,7±0,4	1,8±0,1
B5	4,5±0,2	11,6±0,6	2,6±0,1
B6	4,6±0,3	35±2	7,7±0,3
B7	3,8±0,2	35±2	9,2±0,5
B8	4,1±0,2	31±2	7,7±0,4
B9	4,7±0,3	118±6	25±1
B10	4,1±0,2	35±2	8,4±0,4
B11	4,3±0,2	16±1	3,8±0,2
B12	6,5±0,3	101±5	15,5±0,8
B13	7,2±0,4	53±3	7,3±0,3
B14	4,2±0,3	8,6±0,5	2,0±0,1
B15	4,3±0,2	10,7±0,6	2,5±0,1
Штамм-реципиент B1-537, контроль	10,3±0,5	71±4	6,8±0,4

Клоны B9 и B12 проявляли наибольшую активность к КМЦ (118 и 101 ед/мл соответственно), что коррелировало с мажорной полосой 40 кДа на ДДС-ПААГ, соответствующей ЭГ2д. Однако клон B9 не сохранял свой целлюлазный комплекс (полосы, соответствующие ЦБГ1н и ЦБГ2, практически отсутствовали на электрофореграмме), что могло негативно сказаться на способности целлюлазного комплекса этого клона к осахариванию. В клоне B12 целлюлазный комплекс сохранялся – он и был отобран в качестве продуцента целлюлаз с высоким содержанием ЭГ2д.

Для других серий трансформантов анализ КЖ включал в себя определение ферментативных активностей по отношению к МКЦ, КМЦ и ксилану и проведение тестового гидролиза СНХЦ на разжижение субстрата. ПААГ-электрофорезы клонов данных серий приведены на рисунках 8.2-8.5 Приложения 3.

Тестовый гидролиз СНХЦ проводили в течение двух суток при перемешивании при 50°C, рН 5,0, концентрации субстрата 100 г/л, объём реакционной смеси составлял 10 мл. Дозирование КЖ составляло 10 об.% от общего объёма реакционной смеси. В реакционную среду вносили ФП PV-БГЛ (0,1 вес. % от массы субстрата), обеспечивая насыщение тестируемых ферментных комплексов β-глюкозидазой. В процессе обработки СНХЦ отмечали внешний вид реакционной

смеси: в начале гидролиза субстрат представлял собой комок влажной “ваты” практически без жидкой фракции; если гидролиз проходил успешно, наблюдалась гомогенизация субстрата, его деструкция до мелких частиц, не препятствующих текучести реакционной среды. После 48 ч определяли также концентрацию образовавшихся ВС. На рисунке 24 представлены результаты эксперимента.

После 48 ч гидролиза разжижение субстрата наблюдалось при использовании КЖ следующих клонов: 3, 5, 7 и 9 из серии трансформантов, несущих ген *cbh1<sup>dg</sup>*, А2, А21 и А24 – гены *cbh1<sup>dg</sup>* и *egl2<sup>dg</sup>*, 2, 14 и 18 – гены *cbh1<sup>dg</sup>* и *egl1*, В4, В8, В10 и В11 – гены *egl2<sup>dg</sup>* и *egl1*. Интересно, что высокая гидролитическая способность КЖ, определённая по выходу ВС, не всегда коррелировала со способностью к разжижению субстрата. Для дальнейшего выбора подходящих клонов требовалось более детально оценить их уровень активности по отношению к ключевым субстратам (табл. 13).

Из серии трансформантов, несущих ген *cbh1<sup>dg</sup>*, был выбран клон 9 по совокупности высоких активностей к КМЦ (130 ед/мг), ксилану (210 ед/мг), МКЦ (1,4 ед/мг), наибольшей концентрации белка среди всех КЖ (10,6 мг/мл).

Из серии трансформантов, несущих гены *cbh1<sup>dg</sup>* и *egl2<sup>dg</sup>*, для получения препарата был выбран клон А2, КЖ которого обладала наибольшей активностью к КМЦ (130 ед/мг) и МКЦ (1,4 ед/мг) из этой серии.

Из серии трансформантов, несущих гены *cbh1<sup>dg</sup>* и *egl1<sup>dg</sup>*, был выбран клон 18, так как соответствующая КЖ обладала наибольшими из данной серии значениями активности по отношению к КМЦ и МКЦ (88 и 1,6 ед/мг соответственно).

Среди трансформантов, несущих гены *egl2<sup>dg</sup>* и *egl1<sup>dg</sup>*, отбор проводили по уровню КМЦ-азной активности, как целевой для данной серии. Был выбран клон В4, КЖ которого проявляла наибольшую активность (160 ед/мг).

Таким образом по результатам скрининга полученных КЖ были отобраны по одному клону из каждой серии трансформантов для получения на их основе сухих ФП.

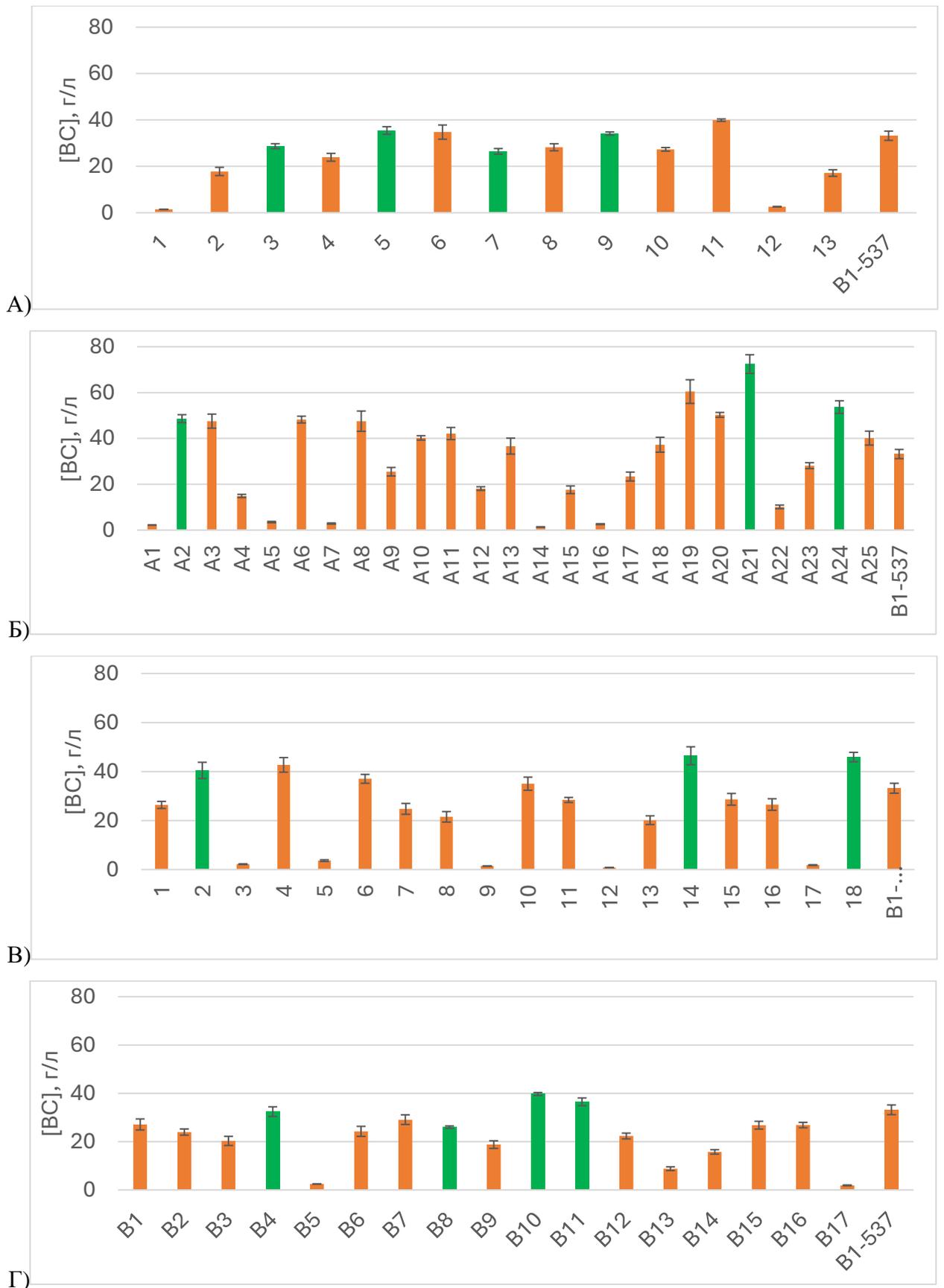


Рисунок 24. Выход ВС через 48 ч гидролиза СНХЦ под действием КЖ клонов, несущих ген *cbh1<sup>dg</sup>* (А), гены *cbh1<sup>dg</sup>* и *egl2<sup>dg</sup>* (Б), гены *cbh1<sup>dg</sup>* и *egl1* (В) и гены *egl2<sup>dg</sup>* и *egl1* (Г). Зелёным выделены столбцы, соответствующие КЖ, действие которых привело к разжижению субстрата после 48 ч обработки.

Таблица 13. Концентрация белка (мг/мл) и активность (ед/мг) к ряду субстратов КЖ, способных к разжижению СНХЦ. Жирным выделены клоны, которые использовали для получения ФП.

Целевой ген (гены), № клона	Белок	КМЦ	Ксилан	МКЦ
ген <i>cbh1<sup>dg</sup></i> , 3	7,9±0,1	120±10	91±7	1,2±0,1
ген <i>cbh1<sup>dg</sup></i> , 5	8,4±0,1	100±7	180±10	1,4±0,1
ген <i>cbh1<sup>dg</sup></i> , 7	10,1±0,6	190±10	250±10	1,2±0,1
<b>ген <i>cbh1<sup>dg</sup></i>, 9</b>	10,6±0,9	130±10	210±10	1,4±0,1
<b><i>cbh1<sup>dg</sup></i> и <i>egl2<sup>dg</sup></i>, A2</b>	8,4±0,6	130±10	130±10	1,4±0,1
<i>cbh1<sup>dg</sup></i> и <i>egl2<sup>dg</sup></i> , A21	8,3±0,1	108±4	200±10	1,3±0,1
<i>cbh1<sup>dg</sup></i> и <i>egl2<sup>dg</sup></i> , A24	6,7±0,4	110±10	120±10	1,0±0,1
<i>cbh1<sup>dg</sup></i> и <i>egl1</i> , 2	6,6±0,6	79±5	180±10	1,2±0,1
<i>cbh1<sup>dg</sup></i> и <i>egl1</i> , 14	6,6±0,3	67±5	107±6	1,5±0,1
<b><i>cbh1<sup>dg</sup></i> и <i>egl1</i>, 18</b>	5,8±0,4	88±8	170±10	1,6±0,1
<b><i>egl2<sup>dg</sup></i> и <i>egl1</i>, B4</b>	6,0±0,5	160±10	126±6	0,9±0,1
<i>egl2<sup>dg</sup></i> и <i>egl1</i> , B8	4,6±5,2	94±6	72±4	0,8±0,1
<i>egl2<sup>dg</sup></i> и <i>egl1</i> , B10	6,6±0,8	150±10	200±20	1,1±0,1
<i>egl2<sup>dg</sup></i> и <i>egl1</i> , B11	4,5±0,7	103±7	240±20	1,8±0,1
Штамм-реципиент В1-537, контроль	5,9±0,4	62±5	230±20	1,4±0,1

## 9.2. Активности новых ФП

Были получены следующие ФП: PV-ЦБГ1д (#3.749.2, ген *cbh1<sup>dg</sup>*, клон 9), PV-ЭГ2д (#3.761.2, ген *egl2<sup>dg</sup>*, клон B12), PV-ЦБГ1д-ЭГ2д (#3.750.1, гены *cbh1<sup>dg</sup>* и *egl2<sup>dg</sup>*, клон A2), PV-ЭГ1-ЦБГ1д (#3.752.2, гены *egl1* и *cbh1<sup>dg</sup>*, клон 18), PV-ЭГ1-ЭГ2д (#3.753.1, гены *egl1* и *egl2<sup>dg</sup>*, клон B4).

Препарат PV-ЭГ2д был получен в процессе культивирования клона B12 рекомбинантного штамма *P. verruculosum* в однолитровом ферментёре, препараты PV-ЦБГ1д, PV-ЦБГ1д-ЭГ2д, PV-ЭГ1-ЦБГ1д, PV-ЭГ1-ЭГ2д – культивированием соответствующих штаммов в колбах. По окончании процесса культивирования полученные КЖ замораживали, а затем лиофилизовали для получения сухих ФП.

В полученных сухих ФП были измерены активности по отношению к специфическим субстратам (табл. 14), проведён ДДС-ПААГ-электрофорез (рис. 25) и определён состав ФП методом тонкого хроматографического фракционирования.

Таблица 14. Параметры исследуемых препаратов: концентрация белка (мг/г), абсолютные активности к ряду субстратов (ед/г) (удельные, ед/мг белка).

ФП	Белок	КМЦ	Ксилан	МКЦ	п-НФ-β-Глк	Ксилоглюкан
PV-ЦБГ1д	250±20	3400±200 (14±2)	6400±400 (25±3)	110±10 (0,46±0,07)	120±8 (0,50±0,09)	1900±100 (7,7±0,9)
PV-ЦБГ1д-ЭГ2д	250±20	3600±300 (14±2)	7200±400 <b>(29±4)</b>	100±10 (0,41±0,07)	200±20 (0,77±0,09)	1600±80 (6,3±0,9)
PV-ЦБГ1д-ЭГ1	250±20	5600±200 (22±2)	6300±500 (25±4)	310±30 <b>(1,2±0,2)</b>	480±40 (1,9±0,3)	4500±300 <b>(18±2)</b>
PV-ЭГ1-ЭГ2д	280±10	6700±500 <b>(24±3)</b>	5100±400 (18±2)	220±20 (0,80±0,09)	200±10 (0,71±0,08)	5200±200 <b>(19±2)</b>
PV-ЭГ2д	860±20	20000±1500 <b>(23±2)</b>	12000±1000 (14±1)	320±30 (0,37±0,04)	51±4 (0,06±0,01)	5200±300 (6,0±0,5)
B1-537, контроль	960±40	6400±400 (7±1)	15000±1000 (16±3)	720±60 (0,75±0,09)	1300±50 (1,4±0,2)	3600±200 (3,8±0,6)

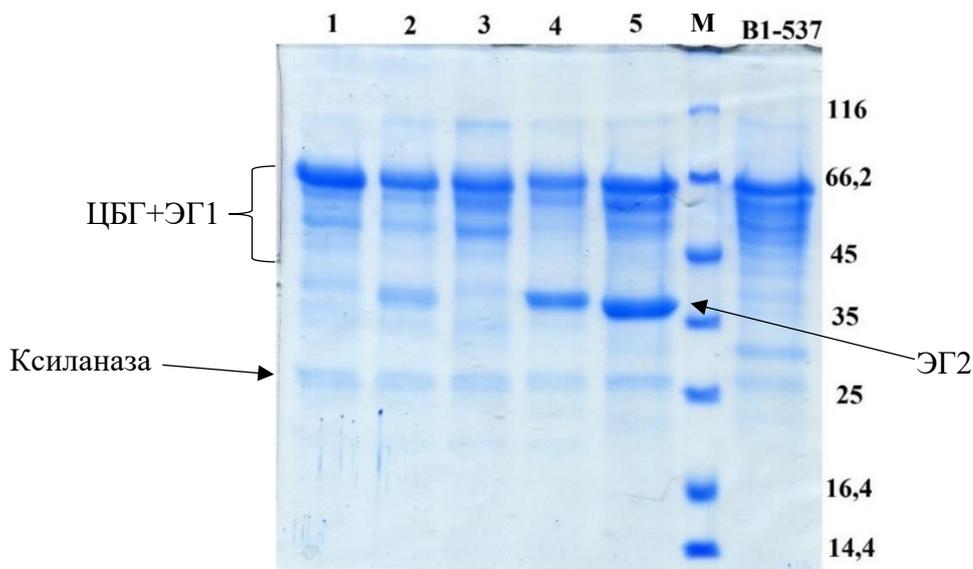


Рисунок 25. ПААГ-электрофореграмма исследуемых препаратов: PV-ЦБГ1д (1), PV-ЦБГ1-ЭГ2д (2), PV-ЦБГ1д-ЭГ1 (3), PV-ЭГ1-ЭГ2д (4), PV-ЭГ2д (5).

Наибольшей активностью по отношению к МКЦ обладал препарат PV-ЦБГ1д-ЭГ1 (310 ед/г), причём удельная активность данного препарата (1,2 ед/мг белка) превосходила удельную активность контрольного препарата B1-537, полученного на основе штамма-реципиента (0,75 ед/мг). Это связано с тем, что и ЦБГ1д, и ЭГ1 обладали активностью к МКЦ.

Активность по отношению к КМЦ увеличилась для всех полученных препаратов, наибольшими её значениями характеризовались ФП PV-ЭГ1-ЭГ2д и PV-ЭГ2д. Удельная активность в этом случае увеличилась в 3,5 раза по сравнению с активностью контрольного препарата (с 7 до 24 ед/мг белка). Это можно объяснить высоким содержанием ЭГ2 (20–35 % от общего пула ферментов). ЭГ1 обладала ксилотрипсиназной активностью, присутствие этого фермента в составе ФП сильно увеличило соответствующую активность. Так, для препаратов PV-ЦБГ1д-ЭГ1 и PV-ЭГ1-ЭГ2д (18–19 ед/мг) наблюдалось увеличение активности к ксилотрипсину в 5 раз по сравнению с активностью контрольного препарата (3,8 ед/мг).

Удельная ксилотрипсиназная активность у всех полученных ФП была близка или превышала активность контрольного препарата. Следует отметить, что более высокое значение удельной активности к ксилану (25–29 ед/мг) имели ФП с клонированной ЦБГ1д.

На электрофореграммах препаратов PV-ЦБГ1-ЭГ2д, PV-ЭГ1-ЭГ2д и PV-ЭГ2д присутствовала мажорная полоса 40 кДа, соответствующая ЭГ2. Присутствие ЭГ1 в препаратах подтвердить с помощью ДДС-электрофореза не было возможно, так как фермент имеет массу ~60 кДа, близкую к массе ЦБГ2. Для подтверждения наличия ЭГ1 в препаратах проводился масс-спектрометрический анализ трипсиновых гидролизатов соответствующих белковых полос, вырезанных из электрофорезного геля.

На рисунке 26 в качестве примера приведён масс-спектрометрический анализ полосы 60 кДа препарата PV-ЦБГ1д-ЭГ1, которая соответствует ЭГ1 *T.reesei*. Было проведено теоретическое расщепление аминокислотной последовательности под действием трипсина и рассчитаны массы полученных пептидов с использованием программы PeptideMass. Пептиды, относящиеся к ЭГ1, отмечены на рисунке красными точками.

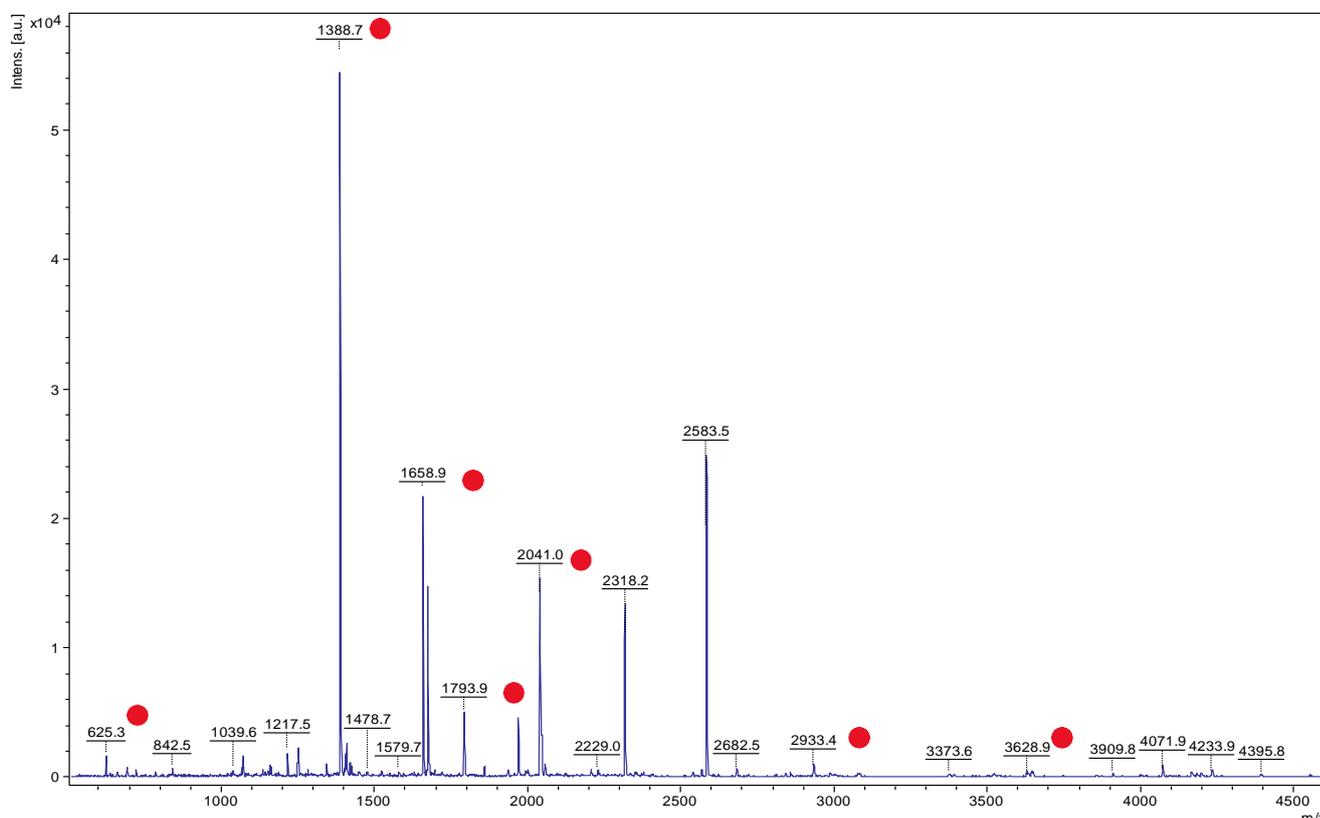


Рисунок 26. Масс-спектр трипсинового гидролизата белковой полосы, соответствующей ЭГ1 *T.reesei*, в препарате PV-ЦБГ1д-ЭГ1. Красными точками обозначены пики, соответствующие идентифицированным пептидам ЭГ1.

### 9.3. Состав ФП, содержащих ЦБГ1д, ЭГ2д и ЭГ1

Определение состава новых ФП, содержащих ЦБГ1д, ЭГ2д и ЭГ1, проводили с помощью метода хроматографического фракционирования с последующим анализом специфических активностей и состава белков во фракциях. Обессоленный препарат наносили на колонку с анионообменным носителем Source 15 Q при pH 6,8; связавшиеся белки элюировали в прямом градиенте NaCl от 0 до 1 М. При необходимости на второй стадии проводили гидрофобную хроматографию на колонке с Source 15 Iso: во фракцию, содержащую несколько ферментов, при перемешивании приливали насыщенный раствор сульфата аммония до его концентрации 1,7 М, полученную фракцию наносили на колонку, уравновешенную раствором 1,7 М сульфата аммония, связавшиеся белки элюировали в обратном градиенте соли до 0 М. Белковый состав фракций идентифицировали с помощью ПААГ-электрофореза. Для каждого пика определяли его

площадь и умножали на коэффициент экстинкции основного белка этой фракции. Для определения доли белка в мультиферментном препарате полученное значение делили на общую площадь хроматограммы, помноженную на среднее значение коэффициента экстинкции (~ 1,7).

Известно, что при анионообменной хроматографии препаратов на основе *P.verruculosum* в градиенте NaCl целлюбиогидролазы элюируются в начале градиента при концентрации NaCl до 0,2 М, причём первой выходит ЦБГ2, а за ней ЦБГ1н. Раздвоение пика обеих ЦБГ связано с тем, что и у ЦБГ1н, и у ЦБГ2 есть более лёгкие формы ферментов без ЦСМ. ЭГ2н элюируется при концентрации NaCl порядка 0,4 М и практически не содержит примесных белков. Собственные ксиланазы *P.verruculosum* не связываются с носителем в используемых условиях анионообменной хроматографии. ЭГ1 (при наличии её в препарате) элюируется вместе с ЦБГ1, и на этапе анионообменной хроматографии разделить эти два фермента не представляется возможным.

На рисунке 27 в качестве примера приведены результаты фракционирования контрольного препарата В1-537 (рис. 27А) и препарата PV-ЭГ2д, содержащего ЭГ2д (рис. 27Б). В случае ФП PV-ЭГ2д видно явное увеличение пика, относящегося к ЭГ2 (ЭГ2н и ЭГ2д не разделялись в условиях хроматографии, и далее под ЭГ2 подразумевается смесь двух форм). Хроматограммы фракционирования новых ФП, ПААГ-электрофореграммы и таблица с соотношением фракций целевым белкам приведены на рисунках 9.1-9.5, 10.1-10.5 и в таблице 1 Приложения 3 соответственно. Результаты определения белкового состава исследуемых ФП приведены в таблице 15.

Таблица 15. Состав исследуемых препаратов.

Препарат	Содержание фермента, %				
	ЦБГ1н+ЦБГ1д	ЦБГ2	ЭГ2н+ЭГ2д	ЭГ1	Ксиланазы
PV-ЭГ2д	16±1	13±1	35±3	0	2,3±0,2
PV-ЦБГ1д	39±2	14±1	1,0±0,1	0	4,5±0,3
PV-ЦБГ1д-ЭГ2д	21±2	11±1	12±1	0	2,9±0,1
PV-ЦБГ1д-ЭГ1	20±1	16±1	0,5±0,1	3,4±0,5	1,5±0,1
PV-ЭГ1-ЭГ2д	19±1	7,1±0,3	20±2	2,3±0,2	1,8±0,1
В1-537, контроль	33±2	27±1	3,0±0,4	0	3,2±0,2

На хроматограммах препаратов PV-ЦБГ1-ЭГ2д, PV-ЭГ1-ЭГ2д и PV-ЭГ2д видно увеличение пика, соответствующего ЭГ2 по сравнению с контрольным ФП В1-537, причём в случае препарата PV-ЦБГ1-ЭГ2д оно было незначительным (содержание ЭГ2 выросло в 3 раза

относительно контрольного препарата), а в случае препаратов PV-ЭГ1-ЭГ2д и PV-ЭГ2д содержание ЭГ2 выросло в 7 и 12 раз соответственно.

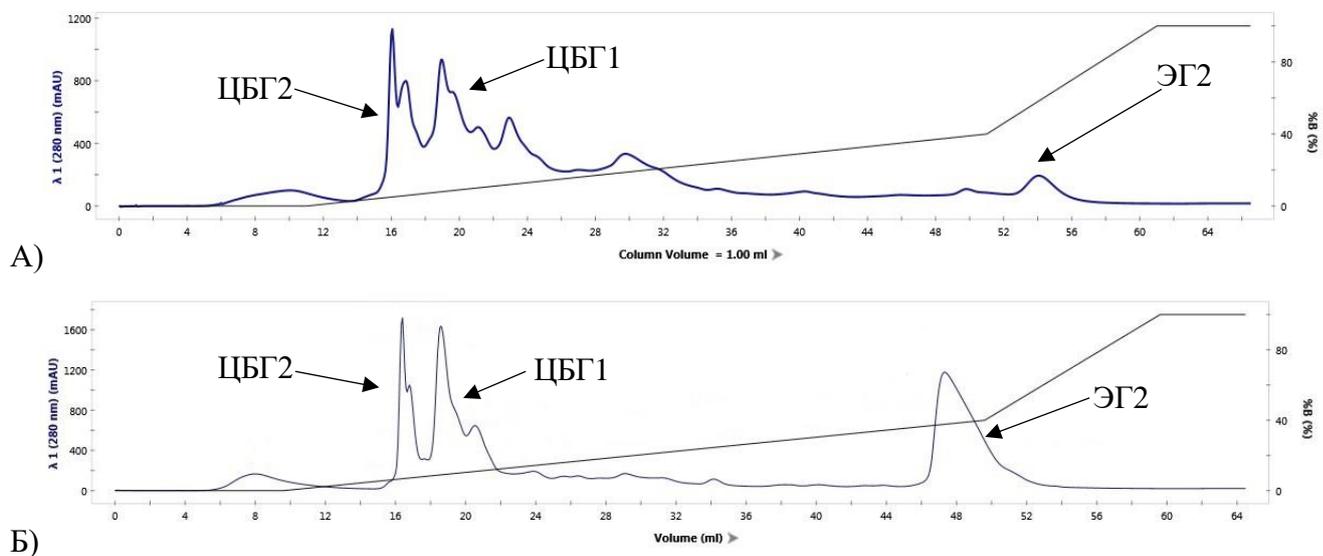


Рисунок 27. Хроматограммы разделения контрольного препарата В1-537 (А) и препарата PV-ЭГ2д (Б) на анионообменнике Source 15Q.

В случае ЦБГ1 (как и в случае с ЭГ2, ЦБГ1н и ЦБГ1д не разделялись в условиях хроматографии, и далее под ЦБГ1 подразумевается смесь двух форм) заметного визуального увеличения пика в соответствующих препаратах не наблюдалось. В процентном соотношении содержание ЦБГ1 увеличилось только в случае препарата PV-ЦБГ1д и составило 39% (содержание ЦБГ1 в контрольном ФП составляло 33%). Также для всех ФП наблюдалось снижение содержания ЦБГ2 в 2–3 раза. Это можно объяснить тем, что в В1-537 ЦБГ занимают доминирующую позицию и увеличение концентрации каких-либо других ферментов приводит к неизбежному снижению концентрации ЦБГ. Видимо с этим связано уменьшение удельной активности большинства новых препаратов к МКЦ, отображенная в таблице 14.

Так как ЭГ1 не удалось отделить от ЦБГ1 в процессе анионообменной хроматографии, то фракции, содержащие смесь этих ферментов, подвергли дополнительному этапу разделения с помощью гидрофобной хроматографии на носителе Source 15Iso (на рисунке 28 в качестве примера представлена хроматограмма, полученная при разделении фракции V препарата PV-ЦБГ1д-ЭГ1). В данных условиях пики ЦБГ1 и ЭГ1 не перекрывались, и по их площади была рассчитана доля каждого фермента. Содержание ЭГ1 в ФП PV-ЦБГ1д-ЭГ1 составило 3,4%, в ФП PV-ЭГ1-ЭГ2д – 2,3%.

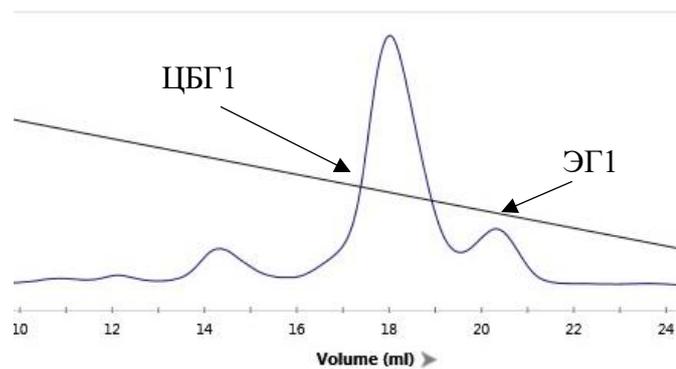


Рисунок 28. Хроматограмма разделения фракции V препарата PV-ЦБГ1д-ЭГ1 на гидрофобном носителе Source 15Iso.

\*\*\*

Таким образом были отобраны штаммы-продуценты *P.verruculosum* с ЦБГд, ЭГ2д и/или ЭГ1 и на их основе получены соответствующие ФП, которые характеризовались увеличенными активностями по отношению к КМЦ, ксилану и ксилоглюкану, как правило, за счет включения эндоглюканаз. Содержание ключевых ферментов в новых ФП составило:

- в препарате PV-ЦБГ1д – 39% ЦБГ1, 14% ЦБГ2 и 1% ЭГ2;
- в препарате PV-ЦБГ1д-ЭГ2д – 21% ЦБГ1, 11% ЦБГ2 и 12% ЭГ2;
- в препарате PV-ЦБГ1д-ЭГ1 – 20% ЦБГ1, 16% ЦБГ2, 0,5% ЭГ2 и 3,4% ЭГ1;
- в препарате PV-ЭГ1-ЭГ2д – 19% ЦБГ1, 7,1% ЦБГ2, 20% ЭГ2 и 2,3% ЭГ1;
- в препарате PV-ЭГ2д – 16% ЦБГ1, 13% ЦБГ2 и 3% ЭГ2.

## 10. Свойства ФП, содержащего вспомогательные ферменты (ПМО и БГЛ)

Очевидно, что для реализации процесса биоконверсии ЦСС можно подобрать такие ФП, в которых соотношение нужных ферментов оптимально или близко к такому. Однако проще добиться оптимального соотношения ферментов, если использовать смеси нескольких ФП. В лаборатории биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН был получен препарат с высоким содержанием вспомогательных ферментов ПМО и БГЛ, который можно рассматривать как перспективную добавку к препаратам основных целлюлаз.

ФП, содержащий ПМО и БГЛ, был получен на основе штамма-реципиента В1-537 с использованием генетических конструкций, в которых под промотором *cbhI* находились гены гомологичной ПМО и гетерологичной БГЛ *A.niger* (препарат получил название PV-ПМО-БГЛ).

Для сравнительного анализа свойств ФП PV-ПМО-БГЛ мы использовали препарат PV-БГЛ с увеличенным содержанием БГЛ. В таблице 16 представлены характеристики препаратов, на рисунке 29 – ДДС-электрофореграмма белков препаратов.

ФП PV-ПМО-БГЛ и PV-БГЛ обладали высокой  $\beta$ -глюкозидазной активностью (по отношению к *n*-НФ-Глк) – 31,8 и 61,1 ед/мг белка;  $\beta$ -глюкозидазная активность контрольного ФП В1-537 была низкой. На электрофореграмме препаратов вспомогательных ферментов была четко видна полоса около 100 кДа, соответствующая БГЛ.

Активность ПМО по отношению к 2,6-ДМФ в случае ФП PV-ПМО-БГЛ составила 0,041 ед/мг белка, а в В1-537 и PV-БГЛ отсутствовала. На электрофореграмме препарата PV-ПМО-БГЛ была четко видна полоса 33 кДа, соответствующая БГЛ.

КМЦазная (эндоглюканазная) активность препаратов PV-ПМО-БГЛ, PV-БГЛ была близкой (около 3,0 ед/мг белка), в ФП В1-537 активность к КМЦ была выше и составляла 13 ед/мг белка. Активность по отношению к МКЦ (целлобиогидролазная активность) возрастала от 0,31 до 0,86 ед/мг в ряду ФП PV-ПМО-БГЛ, PV-БГЛ и В1-537. Удельная активность ксиланазы в ФП PV-ПМО-БГЛ и PV-БГЛ составляла около 3,0 ед/мг белка, тогда как в В1-537 – 20 ед/мг.

Таблица 16. Удельные активности (ед/мг белка) и содержание основных ферментов (%) в ФП

Препарат	ДМФ	<i>n</i> -НФ- $\beta$ -Глк	МКЦ	КМЦ	Ксилан	ПМО	БГЛ*	ЦБГ	ЭГ
PV-ПМО-БГЛ	0,041±0,003	31,8±0,7	0,31±0,02	3,0±0,3	2,8±0,2	34	43	15	5
PV-БГЛ	0	61,1±0,9	0,40±0,03	3,4±0,3	3,3±0,3	0	80	10	5
В1-537, контроль	0	1,80±0,08	0,86±0,07	13,0±0,9	20±1	<1	3	60	10

\* собственная и рекомбинантная БГЛ

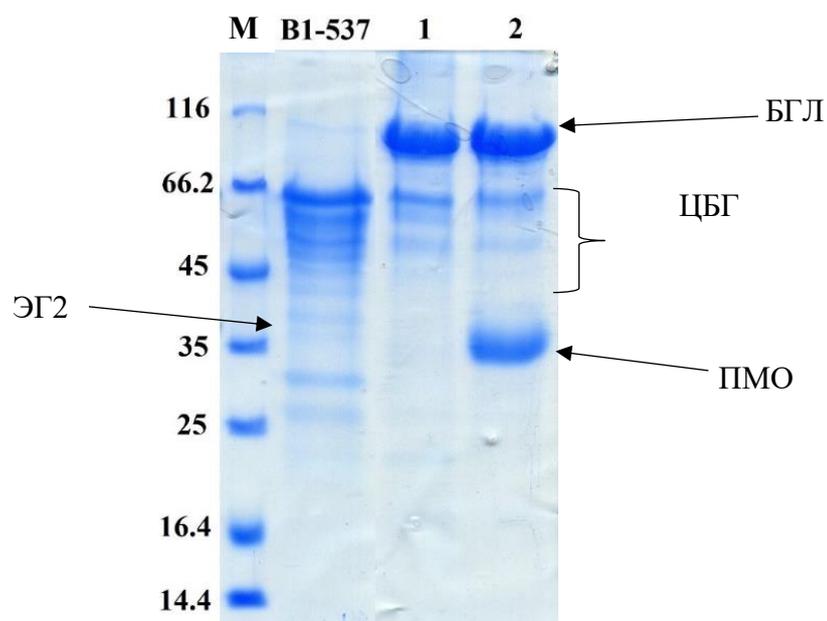


Рисунок 29. Результаты ПААГ-электрофореза препаратов вспомогательных ферментов и контрольного препарата В1-537. 1 – RV-БГЛ, 2 – RV-ПМО-БГЛ. Указаны массы стандартных белков в кДа.

Состав ФП определяли методом тонкого хроматографического фракционирования на анионообменнике Source 15Q (рис. 30). Пики, соответствующие ПМО и БГЛ, выходили в середине градиента NaCl и не сливались между собой и с другими пиками, что позволяло определить состав данного препарата уже после стадии анионообменной хроматографии (табл. 16). Содержание ферментов в RV-ПМО-БГЛ составило 34% (ПМО) и 43% (БГ) от общего количества белка; препарат также содержал небольшое количество ЦБГ (15%) и ЭГ (5%). Таким образом ФП RV-ПМО-БГЛ представляется перспективным в качестве добавки к “базовому” целлюлазному комплексу.

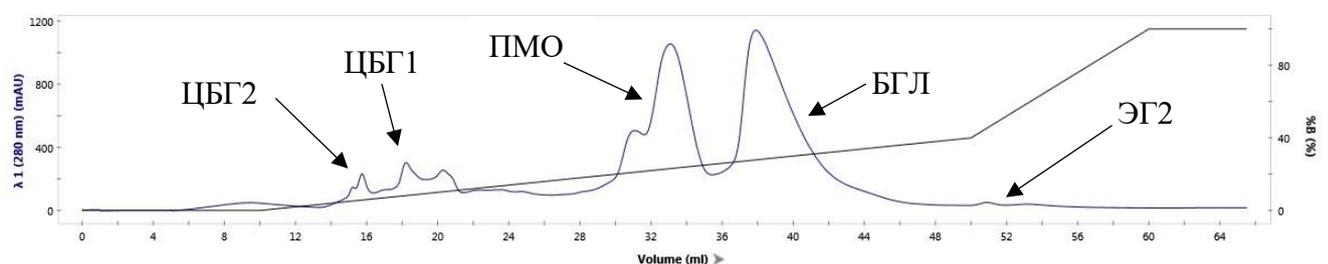


Рисунок 30. Результаты фракционирования препарата RV-ПМО-БГЛ на анионообменнике Source 15Q.

## 11. Гидролитическая способность новых целлюлолитических ФП

Для оценки осахаривающей способности новых препаратов был проведён гидролиз МКЦ, СНЛЦ, СНХЦ и ЩТ. Гидролиз проводили рН 5,0 при 55°C в течение четырёх суток при перемешивании. Аликвоты отбирали через 6, 24, 48, 72 и 96 ч после начала гидролиза и определяли в них концентрацию ВС.

Исходная концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 100 г/л, общая концентрация белка – 10 мг/г субстрата. Для гидролиза использовали как индивидуальные ФП, так и их смеси, в которых 10% по белку заменяли на ФП PV-БГЛ или ФП PV-ПМО-БГЛ. Для оценки вклада вспомогательных ФП проводили гидролиз субстратов только этими ФП с концентрацией белка 1 г/л (что соответствует их концентрации в реакционной смеси при добавлении к основным препаратам). В Приложении 4 на рисунках 11-14 представлены графики зависимости концентрации ВС от времени гидролиза различных субстратов, в таблицах 2-4 – состав и концентрация низкомолекулярных сахаров, накапливающихся после 24 (как характеристика начального периода) и 96 ч обработки (характеристика глубокого гидролиза) СНЛЦ, СНХЦ и ЩТ. В таблицах 17-20 приведены значения концентрации ВС, полученные после 96 ч гидролиза.

### 11.1. Результаты гидролиза различных видов ЦСС

Наибольший выход ВС после 96 ч гидролиза МКЦ (табл. 17) в случае, когда в реакционной смеси присутствовал только основной препарат без вспомогательного, наблюдался для ФП PV-ЦБГ1д-ЭГ1 (67 г/л, на 35% больше, чем в случае контроля В1-537), в чьём составе присутствовали ЭГ1 и ЦБГ1д. Высокая гидролитическая способность PV-ЦБГ1д-ЭГ1 была обусловлена корреляцией с его высокой авицелазной активностью (1,2 ед/мг).

При добавлении в реакционную смесь 10% PV-БГЛ наибольший выход ВС наблюдался для того же препарата (76±1 г/л, на 40% больше, чем выход для смеси ФП В1-537 и PV-БГЛ).

При добавлении в реакционную смесь 10% PV-ПМО-БГЛ для большинства препаратов выход ВС был выше 70 г/л. Лучшим препаратом в данном случае также оказался ФП PV-ЦБГ1д-ЭГ1 – выход ВС составил 78 г/л, но прирост выхода ВС по сравнению со смесью контрольного ФП В1-537 и PV-ПМО-БГЛ был сравнительно небольшим (7%). Следует отметить эффективность препарата ПМО-БГЛ в качестве вспомогательного: смеси всех исследуемых ФП с PV-ПМО-БГЛ обеспечивали более высокий выход ВС по сравнению со смесями с ФП PV-БГЛ.

Вклад препаратов вспомогательных ферментов при гидролизе МКЦ был незначительный и составлял 3,4-3,5 г/л ВС – менее 7% от выхода ВС при действии смеси любого основного и вспомогательного препаратов.

Таблица 17. Концентрация ВС (г/л) после 96 ч гидролиза МКЦ при pH 5,0, 55°C.

Основной препарат	Вспомогательный препарат		
	без добавок	PV-БГЛ	PV-ПМО-БГЛ
В1-537, контроль	49±1	56±3	74±1
PV-ЭГ2д	50±3	57±5	68±6
PV-ЦБГ1д	49±2	58±4	76±1
PV-ЦБГ1д-ЭГ2д	42±3	54±4	74±1
PV-ЦБГ1д-ЭГ1	<b>67±3</b>	<b>76±1</b>	<b>78±1</b>
PV-ЭГ1-ЭГ2д	41±2	57±3	60±2
PV-БГЛ	–	3,5±0,4	–
PV-ПМО-БГЛ	–	–	3,4±0,1

В ходе гидролиза СНЛЦ в первую очередь контролировали степень разжижения реакционной смеси, т.к. в начальный момент времени субстрат представлял собой ватообразную субстанцию, и жидкой фазы в реакционной смеси было немного. Результаты наблюдения отражены в таблице 18 окрашиванием ячеек в разные цвета. После 24 ч полное разжижение реакционной смеси наблюдалось при действии препарата PV-ЦБГ1д-ЭГ1 в смесях с PV-БГЛ и PV-ПМО-БГЛ. За 48 и 72 ч произошло разжижение реакционных сред с индивидуальным препаратом PV-ЦБГ1д-ЭГ1, а также со смесями PV-ЦБГ1д или PV-ЭГ1-ЭГ2д с препаратами вспомогательных ферментов. За 96 ч наблюдалось разжижение для смеси контрольного препарата В1-537 и препарата PV-ПМО-БГЛ.

Таблица 18. Концентрация ВС (г/л) после 96 ч гидролиза СНЛЦ при pH 5,0, 55°C. **Коричневым** цветом обозначены смеси, разжижение в которых произошло через 24 ч гидролиза, **оранжевым** – 48 ч, **светло-коричневым** – 72 ч, **светло-жёлтым** – 96 ч.

Основной препарат	Вспомогательный препарат		
	без добавок	PV-БГЛ	PV-ПМО-БГЛ
Контроль, В1-537	48±3	57±5	68±2
PV-ЭГ2д	42±1	49±2	56±3
PV-ЦБГ1д	48±4	59±4	71±2
PV-ЦБГ1д-ЭГ2д	40±2	50±3	57±1
PV-ЦБГ1д-ЭГ1	<b>68±5</b>	<b>79±6</b>	<b>88±5</b>
PV-ЭГ1-ЭГ2д	60±1	63±3	75±1
PV-БГЛ	–	3,0±0,2	–
PV-ПМО-БГЛ	–	–	3,5±0,4

Действие препаратов PV-ЭГ2д, PV-ЦБГ1д-ЭГ2д и контрольного В1-537 как индивидуальных, так и в смесях с БГЛ не приводило к разжижению реакционной смеси даже после 96 ч гидролиза.

Наибольший выход ВС после 96 ч (табл. 18) наблюдался при использовании в индивидуальном виде ФП PV-ЦБГ1д-ЭГ1 и составил 68 г/л. В присутствии препарата PV-БГЛ выход ВС для ФП PV-ЦБГ1д-ЭГ1 и PV-ЭГ1-ЭГ2д составил 79 и 63 г/л соответственно, что на 10–40% больше выхода ВС для смеси контрольного ФП В1-537 и PV-БГЛ. Смеси этих же препаратов с ФП PV-ПМО-БГЛ показали увеличение выхода ВС на 10–30% по сравнению со смесью контрольного препарата В1-537 и PV-ПМО-БГЛ, концентрация сахаров составила 88 и 75 г/л соответственно.

Выход глюкозы в ходе гидролиза коррелировал с выходом ВС (табл. 2 Приложения 4). Так, после 24 ч наибольшая концентрация глюкозы наблюдалась для смесей препарата PV-ЦБГ1д-ЭГ1 с PV-БГЛ или PV-ПМО-БГЛ и составила 45–47 г/л. После 96 ч наибольшая концентрация глюкозы (63–65 г/л) обеспечивалась препаратами PV-ЦБГ1д-ЭГ1 с PV-БГЛ или PV-ПМО-БГЛ, т.е. теми же комбинациями, которые обеспечивали наибольший выход общих ВС.

Гидролизаты СНЛЦ также содержали ксилозу: наибольшая ее концентрация соответствовала смеси ФП PV-ЦБГ1д-ЭГ1 с PV-ПМО-БГЛ и составляла 5,3 г/л.

Вклад препаратов вспомогательных ферментов при гидролизе СНЛЦ был незначительный и составлял 3,0-3,5 г/л ВС – менее 7% от выхода ВС при действии смеси любого основного и вспомогательного препаратов. Основным продуктом гидролиза была глюкоза (2,4-3,0 г/л).

В ходе гидролиза СНХЦ также контролировали разжижение реакционной смеси, т.к. в начальный момент времени этот субстрат, как и СНЛЦ, представлял собой ватообразную субстанцию (результаты наблюдения представлены в табл. 19). После 24 ч полное разжижение реакционной смеси наблюдалось при действии препарата PV-ЦБГ1д-ЭГ1 в смесях с PV-ПМО-БГЛ. За 96 ч произошло разжижение реакционной среды со смесью ФП PV-ЭГ1-ЭГ2д и PV-БГЛ. Действие ФП PV-ЭГ2д, PV-ЦБГ1д, PV-ЦБГ1д-ЭГ2д и контрольного В1-537 как индивидуальных, так и в смесях с PV-БГЛ или PV-ПМО-БГЛ не приводило к разжижению реакционной смеси даже после 96 ч гидролиза.

Наибольший выход ВС после 96 ч (табл. 19) наблюдался при использовании в индивидуальном виде ФП PV-ЦБГ1д-ЭГ1 и составлял 63 г/л. В присутствии ФП PV-БГЛ выход ВС для ФП PV-ЦБГ1д-ЭГ1 составил 79 г/л, что примерно на 50% больше выхода ВС, наблюдаемого при использовании смеси контрольного ФП В1-537 и PV-БГЛ. Смесь препарата PV-ЦБГ1д-ЭГ1 с ФП PV-ПМО-БГЛ показала увеличение выхода ВС на 45% по сравнению с контролем В1-537 + PV-ПМО-БГЛ, концентрация сахаров составила 86 г/л.

Таблица 19. Концентрация ВС (г/л) после 96 ч гидролиза СНХЦ при pH 5,0, 55°C. **Коричневым** цветом обозначены смеси, разжижение в которых произошло через 24 ч гидролиза, **светло-жёлтым** – 96 ч.

Основной препарат	Вспомогательный препарат		
	без добавок	PV-БГЛ	PV-ПМО-БГЛ
Контроль В1-537	40±1	52±2	60±3
PV-ЭГ2д	48±3	56±4	63±4
PV-ЦБГ1д	43±2	50±2	52±2
PV-ЦБГ1д-ЭГ2д	33±3	48±3	65±5
PV-ЦБГ1д-ЭГ1	<b>63±2</b>	<b>79±4</b>	<b>86±4</b>
PV-ЭГ1-ЭГ2д	49±3	58±1	66±5
PV-БГЛ	–	4,0±0,1	–
PV-ПМО-БГЛ	–	–	4,9±0,3

Выход глюкозы в ходе гидролиза коррелировал с выходом общих ВС (табл. 3 Приложения 4). После 24 ч наибольший выход глюкозы наблюдался при действии смесей препарата PV-ЦБГ1д-ЭГ1 с PV-БГЛ или PV-ПМО-БГЛ и составлял 40–44 г/л. После 96 ч наибольшая концентрация глюкозы (57 г/л) соответствовала смеси ФП PV-ЦБГ1д-ЭГ1 с PV-ПМО-БГЛ.

Гидролизаты СНХЦ также содержали ксилозу: наибольшая ее концентрация после 96 ч обработки соответствовала смеси ФП PV-ЦБГ1д-ЭГ1 с PV-БГЛ и составляла 3,7 г/л.

Вклад препаратов вспомогательных ферментов при гидролизе СНХЦ был незначительный и составлял 4,0-4,9 г/л ВС – менее 10% от выхода ВС при действии смеси любого основного и вспомогательного препаратов. Основным продуктом гидролиза была глюкоза (3,6-4,8 г/л).

При гидролизе ЩТ наибольший выход ВС за 96 ч наблюдался для препаратов PV-ЦБГ1д-ЭГ1 и PV-ЭГ2д (табл. 20). Выход ВС в отсутствие вспомогательных ФП составил 51–52 г/л, на 30% выше, чем выходы ВС, наблюдаемые при использовании контрольного ФП В1-537. Добавление препарата PV-БГЛ в реакционную смесь к ФП PV-ЦБГ1д-ЭГ1 или PV-ЭГ2д привело к увеличению выхода ВС на 40% относительно смеси контрольного ФП В1-537 и PV-БГЛ (63 и 64 г/л соответственно), а добавление препарата PV-ПМО-БГЛ – на 60-50% относительно смеси контрольного ФП В1-537 и PV-ПМО-БГЛ (79 и 73 г/л соответственно).

В случае гидролиза ЩТ, помимо ксилозы и глюкозы в составе гидролизатов присутствовала арабиноза.

Таблица 20. Концентрация ВС (г/л) после 96 ч гидролиза ЦТ при pH 5,0, 55°C.

Основной препарат	Вспомогательный препарат		
	без добавок	PV-БГЛ	PV-ПМО-БГЛ
Контроль В1-537	39±1	45±4	50±4
PV-ЭГ2д	<b>52±4</b>	<b>64±3</b>	<b>73±2</b>
PV-ЦБГ1д	37±2	43±3	50±3
PV-ЦБГ1д-ЭГ2д	34±2	42±1	51±4
PV-ЦБГ1д-ЭГ1	<b>51±4</b>	<b>63±4</b>	<b>79±4</b>
PV-ЭГ1-ЭГ2д	42±3	52±4	63±4
PV-БГЛ	–	4,8±0,4	–
PV-ПМО-БГЛ	–	–	6,5±0,4

Концентрация глюкозы была выше при использовании любого базового препарата совместно с ФП PV-ПМО-БГЛ в сравнении с совместным использованием с ФП PV-БГЛ (табл. 4 Приложения 4). После 24 ч наибольший выход глюкозы наблюдался в случае смеси препаратов PV-ЦБГ1д-ЭГ1 и PV-ПМО-БГЛ и составлял 47 г/л, что на 30% больше, чем выход глюкозы при использовании смеси контрольного ФП В1-537 с PV-ПМО-БГЛ. После 96 ч гидролиза наибольшая концентрация глюкозы была зафиксирована при действии той же смеси и составила 52 г/л (на 34% больше, чем в случае смеси В1-537 и PV-ПМО-БГЛ). Высокая концентрация глюкозы после 96 ч гидролиза была определена в гидролизатах с использованием смеси препаратов PV-ЭГ1-ЭГ2д и PV-ПМО-БГЛ и составляла 45 г/л.

Наибольшее содержание ксилозы после 96 ч гидролиза наблюдалось при действии той же смеси, которая обеспечивала высокую концентрацию глюкозы, и составляла 8,5 г/л, тогда как для контрольной смеси В1-537 + PV-ПМО-БГЛ – 4,2 г/л. Наибольшая концентрация арабинозы была зафиксирована для смеси ФП PV-ЭГ1-ЭГ2д и PV-ПМО-БГЛ и составила 2,4 г/л.

Вклад препаратов вспомогательных ферментов при гидролизе ЦТ составлял 4,8-6,5 г/л ВС – до 13% от выхода ВС при действии смеси любого основного и вспомогательного препаратов. Но разница в концентрации ВС, полученных при действии индивидуального основного препарата и действии его смеси со вспомогательным, была больше, чем вклад вспомогательного препарата, что свидетельствовало о наличии синергетического эффекта.

\*\*\*

Таким образом полученные данные позволяют заключить, что лучшим вспомогательным препаратом во всех случаях являлся PV-ПМО-БГЛ. Наиболее эффективной комбинацией для биоконверсии различных видов ЦСС была смесь препаратов PV-ЦБГ1д-ЭГ1 и PV-ПМО-БГЛ – она была использована при проведении дальнейших экспериментов.

## 11.2. Возможность осуществления процесса биоконверсии ЦСС при использовании сверхвысоких концентраций субстрата

Использование высоких концентраций субстрата позволяет снизить эксплуатационные расходы при практической реализации процессов биоконверсии ЦСС. Однако не все ФП способны эффективно осуществлять гидролиз в таких условиях, так как при повышении концентрации субстрата в реакционной смеси выше определённого значения среда становится излишне вязкой, что приводит к проблемам с перемешиванием. Помимо этого, на первый план выходят проблемы, связанные с массопереносом и возможным ингибированием ферментов компонентами субстрата или продуктами реакции, так как их концентрация также возрастает.

Для осуществления процесса гидролиза при повышенной концентрации субстратов (100, 200 и 300 г/л) использовали СНЛЦ, СНХЦ и ЩТ. Дозировка ФП по белку составляла 10 мг/г субстрата. Гидролиз проводился в ёмкостях объёмом 30 мл при перемешивании при 55°C, pH 5,0 в течение 4 суток, объём реакционной смеси составлял 10 мл. Для гидролиза использовали наиболее эффективную смесь препаратов PV-ЦБГ1д-ЭГ1 и PV-ПМО-БГЛ в соотношении 9/1. Для сравнения использовали ФП, содержащий в своём составе гетерологичные ЭГ1 и БГЛ (PV-ЭГ1-БГЛ, #3.762.2, клон 22), и смесь коммерческого ФП Агроцелл Плюс (#3438) с добавлением PV-БГЛ в соотношении 9/1 по белку – ранее в нашей лаборатории было показано, что эти ФП обладают высокой гидролитической активностью.

В таблице 21 приведены концентрации ВС и рассчитанные значения степени конверсии субстрата после 96 ч гидролиза, а также отмечены результаты наблюдения за разжижением реакционной среды. Степень конверсии субстрата рассчитывали как отношение концентрации ВС после 96 ч гидролиза к исходной концентрации субстрата, умноженной на 1,1 (коэффициент перехода глюкозидного звена в глюкозу в процессе гидролиза), выраженное в процентах. На рис. 15.1-15.9 и 16 Приложения 5 представлены зависимости концентрации ВС от времени гидролиза и внешний вид реакционных сред после 24 и 96 ч гидролиза, в таблице 5 Приложения 5 – концентрации низкомолекулярных сахаров в гидролизатах после 24 и 96 ч.

После 24 ч гидролиза полному разжижению подверглись все реакционные смеси, исходная концентрация субстрата в которых составляла 100 г/л (рис. 16 Приложения 5). После 48 ч разжижение наблюдалось для всех субстратов в концентрации 200 г/л, которые подвергались воздействию смеси препаратов PV-ЦБГ1д-ЭГ1 и PV-ПМО-БГЛ, а после 72 ч произошло разжижение реакционной смеси с исходной концентрацией 200 г/л СНЛЦ и ЩТ, которые подверглись воздействию препарата PV-ЭГ1-БГЛ. После 96 ч гидролиза произошло разжижение СНХЦ (200 г/л) под действием ФП PV-ЭГ1-БГЛ, СНЛЦ (200 г/л) под действием смеси Агроцелл Плюс и БГЛ; среди субстратов с исходной концентрацией 300 г/л полное разжижение произошло

во всех случаях использования смеси PV-ЦБГ1д-ЭГ1 и PV-ПМО-БГЛ, и в случае СНХЦ, обработанного препаратом PV-ЭГ1-БГЛ.

Таблица 21. Концентрация ВС (г/л) после 96 ч гидролиза ряда субстратов, в скобках указана степень конверсии субстрата. **Коричневым** цветом обозначены смеси, разжижение в которых произошло через 24 ч гидролиза, **оранжевым** – 48 ч, **светло-коричневым** – 72 ч, **светло-жёлтым** – 96 ч.

Субстрат	Концентрация, г/л	Препарат/смесь препаратов		
		PV-ЦБГ1д-ЭГ1 + PV-ПМО-БГЛ	PV-ЭГ1-БГЛ	Агроцелл Плюс + PV-БГЛ
СНЛЦ	100	<b>88±5 (80%)</b>	<b>81±5 (73%)</b>	<b>75±5 (68%)</b>
	200	118±6 (53%)	100±7 (45%)	84±3 (38%)
	300	132±9 (40%)	113±7 (34%)	97±9 (29%)
СНХЦ	100	<b>86±4 (78%)</b>	<b>82±5 (74%)</b>	<b>76±6 (69%)</b>
	200	149±2 (67%)	118±9 (53%)	97±6 (44%)
	300	187±15 (56%)	163±8 (49%)	114±4 (34%)
ЩТ	100	<b>79±4 (72%)</b>	<b>77±4 (69%)</b>	<b>72±4 (65%)</b>
	200	133±7 (60%)	117±6 (53%)	94±4 (42%)
	300	164±13 (49%)	144±10 (43%)	121±9 (36%)

Вне зависимости от природы субстрата и его концентрации наибольший выход ВС наблюдался при действии смеси препаратов PV-ЦБГ1д-ЭГ1 и PV-ПМО-БГЛ. В случае СНЛЦ при исходной концентрации субстрата 100, 200 и 300 г/л для данной смеси препаратов концентрация ВС после 96 ч составила 88, 118 и 132 г/л соответственно, для ЩТ – 79, 133 и 164 г/л соответственно, для СНХЦ (наиболее предпочтительный субстрата для данной смеси ФП) – 86, 149 и 187 г/л соответственно.

В случае использования препарата PV-ЭГ1-БГЛ концентрация ВС для в случае исходной концентрации любого субстрата 100 г/л составила 77-82 г/л, при концентрации 200 г/л – 100-118 г/л, при концентрации 300 г/л – 113-163 г/л.

При действии смеси Агроцелл Плюс с PV-БГЛ в случае исходной концентрации любого субстрата 100 г/л концентрация ВС составила 72–76 г/л, при концентрации 200 г/л – 84-97 г/л, при концентрации 300 г/л – 97-121 г/л.

Следует отметить, что и выход кривой зависимости накопления ВС от времени на плато с исчерпывающим гидролизом наблюдался только при использовании исходной концентрации субстратов 100 г/л (рис. 15 Приложения 5). При концентрации субстратов 200 и 300 г/л исчерпывающего гидролиза достигнуто не было.

Основными сахарами, образующимися при гидролизе субстратов, были ксилоза, глюкоза и арабиноза (накопление последней наблюдалось при гидролизе ЩТ).

Процесс гидролиза проходил наиболее интенсивно при невысокой концентрации субстратов и менее интенсивно при её увеличении. Итоговая (после 96 ч) степень конверсии субстратов с концентрацией 300 г/л до ВС составляла 30–55% (16–21% до глюкозы), тогда как при гидролизе субстратов с исходной концентрацией 100 г/л конверсия до ВС составляла 65–80% (42–57% до глюкозы).

\*\*\*

Таким образом, нами было установлено, что смесь препаратов PV-ЦБГ1д-ЭГ1 и PV-ПМО-БГЛ в соотношении 9/1 показала большую эффективность по сравнению с препаратом PV-ЭГ1-БГЛ и смесью препаратов Агроцелл Плюс и PV-БГЛ в соотношении 9/1. Увеличение выхода ВС в случае смеси препаратов PV-ЦБГ1д-ЭГ1 и PV-ПМО-БГЛ составило 15–65% по сравнению с действием коммерческого препарата, усиленного PV-БГЛ.

## Заключение

В результате выполнения данной работы было проведено сравнительное изучение гидролитической способности нативных и дегликозилированных форм основных целлюлолитических ферментов гриба *P.verruculosum* – ЦБГ1 и ЭГ2, а также гидролитической способности ЭГ1 *T.reesei*. Исследовано каталитическое взаимодействие основных целлюлаз со вспомогательными ферментами (ПМО и БГЛ) при использовании основных ферментов как по отдельности, так и их смесей.

Осуществлён отбор наиболее активных клонов трансформантов, содержащих рекомбинантные ЦБГ1д, ЭГ2д, а также гетерологичную ЭГ1, получены сухие ФП, содержащие ЦБГ1д, ЭГ2д и ЭГ1 в разных комбинациях и соотношениях. Получен ФП, содержащий оба вспомогательных фермента – PV-ПМО-БГЛ. Все новые ФП были охарактеризованы, определены их состав и активности по отношению к различным специфическим субстратам.

Проведён гидролиз разных видов ЦСС под действием полученных новых ФП, содержащих основные ферменты, как в индивидуальном виде, так и в смесях с ФП, содержащими вспомогательные ферменты (PV-БГЛ или PV-ПМО-БГЛ). Наиболее эффективными для осахаривания ЦСС оказалась комбинация препаратов PV-ЦБГ1д-ЭГ1 и PV-ПМО-БГЛ.

## Выводы

1. Сравнение гидролитической способности основных ферментов-целлюлаз по отношению к различным видам ЦСС показало, что их можно расположить в ряд ЦБГ1 – ЭГ1 – ЭГ2 (в порядке убывания их активности); использование этих ферментов в индивидуальном виде обеспечивает глубину конверсии ЦСС 10–30, 5–15 и 1–5% соответственно.
2. Показано, что по гидролитической способности по отношению к различным видам ЦСС дегликозилированные (мутантные) формы ЦБГ1д и ЭГ2д превосходят нативные формы этих ферментов ЦБГ1н и ЭГ2н. В зависимости от вида ЦСС прирост выхода продуктов гидролиза ЦСС составляет 10–55% под действием ЦБГ1д и 10–66% – ЭГ2д относительно действия ЦБГ1н и ЭГ2н соответственно.
3. Установлено, что гомологичную ПМО целесообразно использовать в качестве вспомогательного фермента для основных ферментов целлюлазного комплекса *P.verruculosum*. Показано, что внесение относительно небольшого количества ПМО в реакцию смесь (10–15% от общего содержания основных ферментов) увеличивает гидролитическую способность комплекса на 10%.
4. С помощью различных новых рекомбинантных штаммов *P.verruculosum* получены ферментные препараты с увеличенным содержанием основных ферментов целлюлазного комплекса: ЦБГ1д, ЭГ2д, ЦБГ1д и ЭГ2д, ЦБГ1д и ЭГ1, ЭГ1 и ЭГ2д; а также с увеличенным содержанием вспомогательных ферментов: ПМО и БГЛ. Охарактеризован состав ферментных препаратов, определены их активности по отношению к различным специфичным субстратам.
5. Определена гидролитическая способность целлюлолитических ферментных препаратов, полученных с помощью перечисленных выше рекомбинантных штаммов, по отношению к различным видам ЦСС. Установлено, что наибольшую гидролитическую способность можно обеспечить при одновременном использовании в качестве источника основных целлюлаз препарата PV-ЦБГ1д-ЭГ1, содержащего ЦБГ1д и ЭГ1, и препарата PV-ПМО-БГЛ как источника вспомогательных ферментов.
6. Показано, что совместное использование препарата вспомогательных ферментов PV-ПМО-БГЛ с препаратами основных целлюлаз приводит к большей эффективности процесса гидролиза различных видов ЦСС, чем в случае использования препарата, содержащего только БГЛ.

## Список литературы

1. Moron J.B., Klink G.P.M., Gruter G.J.M. Lignocellulose saccharification: historical insights and recent industrial advancements towards 2nd generation sugars // RSC Sustainability 2025. № 3. P. 1170-1211.
2. Wang Z., Fan Z., Chen X, Li Y., Fan Z., Wei Q., Peng Y., Liu B., Yue W., Wang X., Xiong L. Global oil and gas development situation, trends and enlightenment in 2023 // Petroleum Exploration and Development. 2024. Vol. 51, № 6. P. 1536-1555.
3. Thomas L.P. Global standardization of coal resources and reserves / ed. Osborne D. Woodhead Publishing Series in Energy, The Coal Handbook (Second Edition), Woodhead Publishing. 2023. Vol. 1. P. 53-83.
4. Pscherer T., Krommes S. LCA standards for environmental product assessments in the bioeconomy with a focus on biogenic carbon: A systematic review // The International Journal of Life Cycle Assessment. 2025. Vol. 30. P. 371-393.
5. Ragauskas A.J., Williams C.K., Davison B.H., Britovsek G., Cairney J., Eckert C.A., Frederick W.J., Hallett J.P., Leak D.J., Liott C.L., Mielenz J.R., Murphy R., Templer R., Tschaplinski T. The path forward for biofuels and biomaterials // Science. 2006. Vol. 311, № 5760. P. 484-489.
6. Carmen S. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi // Biotechnology Advances. 2009. Vol. 27, № 2. P. 185-194.
7. Menon V., Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept // Progress in Energy and Combustion Science. 2012. Vol. 38, № 4. P. 522-550.
8. Wohlgemuth R. Enzyme Catalysis for Sustainable Value Creation Using Renewable Biobased Resources // Molecules. 2024. Vol. 29, № 23. P. 5772.
9. Гусаков А.В., Синицын А.П. Деполимеризация природных биополимеров. Ферментативный гидролиз целлюлозы, Химия биомассы: биотоплива и биопластики / ред. Варфоломеев С.Д. М.: Научный мир. 2017. С. 65-99.
10. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P. Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass // Biofuels. 2012. Vol. 3, № 4. P. 463-477.
11. Евилевич А.З., Ахмина Е.И., Раскин М.Н. Безотходное производство в гидролизной промышленности. М.: Лесная промышленность. 1982. С. 4-40.
12. Ptak M., Skowrońska A., Pińkowska H., Krzywonos M. Sugar Beet Pulp in the Context of Developing the Concept of Circular Bioeconomy // Energies. 2022. Vol. 15, № 1. P. 175.
13. Cosgrove D.J. Structure and growth of plant cell walls // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2024. Vol. 25. P. 340–358.

14. Zhang B., Gao Y., Zhang L., Zhou Y. The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions // *Journal of Integrative Plant Biology*. 2021. Vol. 63, № 1. P. 251-272.
15. Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка как динамичная система. М.: Наука. 2007. 429 с.
16. Othmer K. *Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons Inc. 2001. Vol. 13. 866 p.
17. Синицын А.П., Клесов А.А., Рабинович М.Л., Гусаков А.В., Морозов А.М. Биотехнология ферментативного превращения целлюлозы. Итоги науки и техники. Серия Биотехнология, том 12 М.: ВИНТИ. 1988. Т. 12. С. 53.
18. Marchal R., Ropars M., Pourquié J., Fayolle F., Vandecasteele J.P. Large-scale enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic biomass. Part 2: Conversion into acetone-butanol // *Bioresource Technol.* 1992. Vol. 42, № 3. P. 205-217.
19. Синицын А. П., Гусаков А. В., Черноглазов В. М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. М.: Издательство Московского Университета. 1995. 220 с.
20. Sinitsyn, A.P., Gusakov, A.V., Vlasenko, E.Yu. Effect of structural and physico-chemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymatic hydrolysis // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1991. Vol. 30. P. 43-59.
21. Синицын А.П, Синицына О.А Биоконверсия возобновляемой растительной биомассы на примере биоэтанола: сырьё, предобработка, ферменты, процессы, экономика (обзор) // *Успехи биологической химии*. 2021. Т. 61. С. 347–414.
22. Curry T.M., Peña M.J., Urbanowicz B.R. An update on xylan structure, biosynthesis, and potential commercial applications // *The Cell Surface*. 2023. Vol. 9. P. 100101.
23. Holguin-Acuña A.L., Ramos-Chavira N., Carvajal-Millan E., Santana-Rodriguez V., Rascón-Chu A., Niño-Medina G. Chapter 14 – Non-Starch Polysaccharides in Maize and Oat: Ferulated Arabinoxylans and  $\beta$ -Glucans / ed. Preedy V.R., Watson R.R, Patel V.B. *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention*. Academic Press. 2011. P. 153-159.
24. Holtzapple M. Hemicelluloses // *Encyclopedia of food science and nutrition*. 2003. P.3060-3071
25. Dashora K., Gattupalli M., Tripathi G.D., Javed Z., Singh S., Tuohy M., Sarangi P.K., Diwan D., Singh H.B., Gupta V.K. Fungal Assisted Valorisation of Polymeric Lignin: Mechanism, Enzymes and Perspectives // *Catalysts*. 2023. Vol. 13, № 1. P. 149.
26. Ropas M., Marchal R., Porquie J., Wandecasteele P. Large-scale enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic biomass. Part 1: Pretreatment procedures // *Bioresource Technology*. 1992. Vol. 42, № 3. P. 197-204.
27. Новожилов Е.В., Синельников И.Г., Аксенов А.С., Чухчин Д.Г., Тышкунова И.В., Рожкова А.М., Осипов Д.О., Зоров И.Н., Синицын А.П. Биокаталитическая конверсия сульфатной целлюлозы с применением комплексных биокатализаторов на основе рекомбинантных

ферментных препаратов *Penicillium verruculosum*, // Катализ в промышленности. 2015. Т. 15, № 5. С. 78-83.

28. Nanda S., Mohammad J., Reddy S., Kozinski J., Dalai A. Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels // Biomass Conversion and Biorefinery. 2014. Vol. 4. P. 157-191.

29. Agbor V.B., Cicek N., Sparling R., Berlin A., Levin D.B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application // Biotechnology Advances. 2011. Vol. 29, 675-685.

30. Houfani A.A., Andersb N., Spiessb A.C., Baldrianc P., Benallaouaa S. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars – a review // Biomass and Bioenergy. 2020. Vol. 134. P. 105481.

31. Bomble Y.J., Lin C.Y., Amore A., Wei H., Holwerda E.K., Ciesielski P.N., Donohoe B.S., Decker S.R., Lynd L.R., Himmel M.E. Lignocellulose deconstruction in the biosphere // Current Opinion in Chemical Biology. 2017. Vol. 41. P. 61-70.

32. Zeng Y., Himmel M.E., Ding S.-Y. Visualizing chemical functionality in plant cell walls // Biotechnology for Biofuels. 2017. Vol. 10. P. 263.

33. Peciulyte A., Kiskis J., Larsson P.T., Olsson L., Enejder A. Visualization of structural changes in cellulosic substrates during enzymatic hydrolysis using multimodal nonlinear microscopy // Cellulose. 2016. Vol. 23, P. 1521-1536.

34. McCann M.C., Carpita N.C. Biomass recalcitrance: a multi-scale, multi-factor, and conversion-specific property // Journal of Experimental Botany. 2015. Vol. 66, № 14. P. 4109-4118.

35. Nitsos C.K., Lazaridis P.A., Mach-Aigner A., Matis K.A., Triantafyllidis K.S. Enhancing lignocellulosic biomass hydrolysis by hydrothermal pretreatment, extraction of surface lignin, wet milling and production of cellulolytic enzymes // ChemSusChem. 2019. Vol. 12, № 6. P. 1179-1195.

36. Donev E., Gandla M.L., Jonsson L.J., Mellerowicz E.J. Engineering non-cellulosic polysaccharides of wood for the biorefinery // Frontiers in Plant Science. 2018. Vol. 9. P. 1537.

37. Tarasov D., Leitch M., Fatehi P. Lignin-carbohydrate complexes: properties, applications, analyses, and methods of extraction: a review // Biotechnology for Biofuels. 2018. Vol. 11. P. 269.

38. Yang B., Dai Z., Ding S.-Y., Wyman C.E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass // Biofuels. 2011. Vol. 2, № 4. P. 421-449.

39. Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M.J., Stroeve P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production // Industrial and Engineering Chemistry Research. 2009. Vol. 48, № 8. P. 3713-3729.

40. Karimi K., Taherzadeh M.J. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: composition, imaging, and crystallinity // Bioresource Technology. 2016. Vol. 200. P. 1008-1018.

41. Liguori R., Ventrino V., Pepe O., Faraco V. Bioreactors for lignocellulose conversion into

- fermentable sugars for production of high added value products // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015. Vol. 100. P. 597-611.
42. Dibyajyoti H., Kumar M.P. Lignocellulosic conversion into value-added product // *Process Biochemistry*. 2020. Vol. 89. P. 110-133.
43. Alvira P., Tomáspejó E., Ballesteros M., Negro M.J., Pandey A. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review // *Bioresource Technology*. 2010. Vol. 101, № 13. P. 4851-4861.
44. He Y.C., Ma C.L., Yang B. Pretreatment process and its synergistic effects on enzymatic digestion of lignocellulosic materials // *Fungal cellulolytic enzymes. Microbial production and application*. 2018. P. 2-25.
45. Hiden A., Inoue H., Tsukahara K., Fujimoto S., Minowa T., Inoue S., Endo T., Sawayama S. Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw // *Bioresource Technology*. 2009. Vol. 100, № 10. P. 2706-2711.
46. Gu B.-J., Dhumal G.S., Wolcott M.P., Ganjyal G.M. Disruption of lignocellulosic biomass along the length of the screws with different screw elements in a twin-screw extruder // *Bioresource Technology*. 2019. Vol. 275. P. 266-271.
47. Montiel C., Hernández-Meléndez O., Vivaldo-Lima E., Hernández-Luna M., Bárzana E. Enhanced bioethanol production from blue agave bagasse in a combined extrusion-saccharification process // *Bioenergy Research*. 2016. Vol. 9. P. 1005-1014.
48. Choi W.I., Ryu H.J., Kim S.J., Oh K.K. Thermo-mechanical fractionation of yellow poplar sawdust with a low reaction severity using continuous twin screw-driven reactor for high hemicellulosic sugar recovery // *Bioresource Technology*. 2017. Vol. 241. P. 63-69.
49. Yang C.P., Shen Z.Q., Yu G.C., Wang J.L. Effect and aftereffect of gamma radiation pretreatment on enzymatic hydrolysis of wheat straw // *Bioresource Technology*. 2008. Vol. 99, № 14. P. 6240-6245.
50. Bak J.S., Ko J.K., Han Y.H., Lee B.C., Choi I.G., Kim K.H. Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment // *Bioresource Technology*. 2009. Vol. 100, № 3. P. 1285-1290.
52. Ma H., Liu W.W., Chen X., Wu Y., Yu Z. Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment // *Bioresource Technology*. 2009. Vol. 100, № 3. P. 1279-1284.
53. Velmurugan R., Muthukumar K. Utilization of sugarcane bagasse for bioethanol production: Sono-assisted acid hydrolysis approach // *Bioresource Technology*. Vol. 102, № 14. P. 7119-7123.
54. Lee B.-M., Jeun J.-P., Kang P.-H. Enhanced enzymatic hydrolysis of kenaf core using irradiation and dilute acid // *Radiation Physics and Chemistry*. 2017. Vol. 130. P. 216-220
55. Yin Y., Wang J. Enhancement of enzymatic hydrolysis of wheat straw by gamma irradiation-alkaline pretreatment // *Radiation Physics and Chemistry*. 2016. Vol. 123. P. 63-67.

56. Kapoor K., Garg N., Diwan R.K., Varshney L., Tyagi A.K. Study the effect of gamma radiation pretreatment of sugarcane bagasse on its physico-chemical morphological and structural properties // *Radiation Physics and Chemistry*. 2017. Vol. 141. P. 190-195.
57. Liu Y., Guo L., Wang L., Zhan W., Zhou H. Irradiation pretreatment facilitates the achievement of high total sugars concentration from lignocellulose biomass // *Bioresource Technology*. 2017. Vol. 232, P. 270-277.
58. Singh R., Krishna B.B., Kumar J., Bhaskar T. Opportunities for utilization of non-conventional energy sources for biomass pretreatment // *Bioresource Technology*. 2016. Vol. 199. P. 398-407.
59. Kumar A.K., Sharma S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review // *Bioresources and Bioprocess*. 2017. Vol. 4, P. 7.
60. Gogate P.R., Sutkar V.S., Pandit A.B. Sonochemical reactors: important design and scale up considerations with a special emphasis on heterogeneous systems // *Chemical Engineering Journal*. 2011. Vol. 166, № 3. P.1066-1082.
61. Keshwani, D.R., Cheng, J.J. Microwave-based alkali pretreatment of switchgrass and coastal bermudagrass for bioethanol production // *Biotechnology Progress*. 2010. Vol. 26, № 3. P. 644-652.
62. Liu R., Tian W., Kong S., Meng Y., Wang H., Zhang J. Effects of inorganic and organic acid pretreatments on the hydrothermal liquefaction of municipal secondary sludge // *Energy Conversion and Management*. 2018. Vol. 174. P. 661-667.
63. Mishra A., Ghosh S. Bioethanol production from various lignocellulosic feedstocks by a novel «fractional hydrolysis» technique with different inorganic acids and coculture fermentation // *Fuel*. 2019. Vol. 236. P. 544-553.
64. Woiciechowski A.L., Dalmas Neto C.J., Vandenberghe L.P.S., Carvalho Neto D.P., Sydney A.C.N., Letti L.A.J., Karp S.G., Torres L.A.Z., Soccol C.R. Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances // *Bioresource Technology*. 2020. Vol. 304. P. 122848.
65. Yu Z., Du Y., Shang X., Zheng Y., Zhou J. Enhancing fermentable sugar yield from cassava residue using a two-step dilute ultra-low acid pretreatment process // *Industrial Crops and Products*. 2018. Vol. 124. P. 555-562.
66. Nitsos C., Matsakas L., Triantafyllidis K., Rova U., Christakopoulos P. Investigation of different pretreatment methods of mediterranean-type ecosystem agricultural residues: characterization of pretreatment products, high-solids enzymatic hydrolysis and bioethanol production // *Biofuels*. 2018. Vol. 9, №5. P. 545-558.
67. Liu Q., Li W., Ma Q., An S., Li M., Jameel H., Chang H.M. Pretreatment of corn stover for sugar production using a two-stage dilute acid followed by wet-milling pretreatment process // *Bioresource Technology*. 2016. Vol. 211. P. 435-442.

68. Ostovareh S., Karimi K., Zamani A. Efficient conversion of sweet sorghum stalks to biogas and ethanol using organosolv pretreatment // *Industrial Crops and Products*. 2015. Vol. 66. P. 170-177.
69. He Y.C., Liu F., Di J.H., Ding Y., Tao Z.C., Zhu Z.Z., Wu Y.Q., Chen L., Wang C., Xue Y.F., Chong G.G., Ma C.L. Effective enzymatic saccharification of dilute NaOH extraction of chestnut shell pretreated by acidified aqueous ethylene glycol media // *Industrial Crops and Products*. 2016 Vol. 81. P. 129-138.
70. Teramoto Y., Lee S.H., Endo T. Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acidfree ethanol cooking // *Bioresource Technology*. 2008. Vol. 99, № 18. P. 8856-8863.
71. Arato C., Kendall P., Gjennstad G. The Lignol approach to biorefining of woody biomass to produce ethanol and chemicals // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2005. Vol. 123. P. 871-882.
72. Bali G., Meng X., Deneff J.I., Sun Q., Ragauskas A.J. The effect of alkaline pretreatment methods on cellulose structure and accessibility // *ChemSusChem*. 2015. Vol. 8, №2. P. 275-279.
73. Prajapati B.P., Jana U.K., Suryawanshi R.K., Kango N. Sugarcane bagasse saccharification using *Aspergillus tubingensis* enzymatic cocktail for 2G bio-ethanol production // *Renewable Energy*. 2020. Vol. 152. P. 653-663.
74. Liu I., Li Z. An electrogenerated base for the alkaline oxidative pretreatment of lignocellulosic biomass to produce bioethanol // *RSC Advances*. 2017. Vol. 7, № 75. P. 47456-47463.
75. Satelewal A., Agrawal R., Bhagia S., Sangoro J., Ragauskas A.J. Natural deep eutectic solvents for lignocellulosic biomass pretreatment: Recent developments, challenges and novel opportunities // *Biotechnology Advances*. 2018. Vol. 36, № 8. P. 2032-2050.
76. Hidayatullah I.M., Setiadi T., Kresnowati M., Boopathy R. Xylanase inhibition by the derivatives of lignocellulosic materials // *Bioresource Technology*. 2020. Vol. 300. P. 122740.
77. Yang B., Wyman C.E Effect of xylan and lignin removal by batch and flow through pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose // *Biotechnology and Bioengineering*. 2004. Vol. 86, №1. P. 88-98.
78. Putra Z.A. Lignocellulosic biomass pretreatment for biorefinery: a review // *Indonesian Journal of Science & Technology*. 2018. Vol. 3, №1. P. 75-81.
79. Павлов И.Н. Эффект автогидролитической предварительной обработки мискантуса на реакционную способность к ферментативному гидролизу // *Ползуновский вестник*. 2018. №. 1, С. 148-152.
80. Kim K., Hong J. Supercritical CO<sub>2</sub> pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis // *Bioresource Technology*. 2001. Vol. 77, № 2. P. 139-144.
81. Zheng Y., Lin H.M., Wen J., Cao N., Yu X., Tsao G.T. Supercritical carbon dioxide explosion as a pretreatment for cellulose hydrolysis // *Biotechnology Letters*. 1995. Vol. 17. P. 845-850.

82. Gu T., Held M.A., Faik A. Supercritical CO<sub>2</sub> and ionic liquids for the pretreatment of lignocellulosic biomass in bioethanol production // *Environmental Technology*. 2013 Vol. 34, № 13-14. P. 1735-1749.
83. Hatakka A.I., Varesa T., Lunn T.K. Production of multiple lignin peroxidases by the white-rot fungus *Phlebia ochraceofulva* // *Enzyme and Microbial Technology*. 1993. Vol. 15, № 8. P. 664-669.
84. Dai Y., Zhang H.S., Huan B., He Y.C. Enhancing the enzymatic saccharification of bamboo shoot shell by sequential biological pretreatment with *Galactomyces* sp. CCZU11-1 and deep eutectic solvent extraction // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2017. Vol. 40. P. 1427-1436.
85. Dai Y.Z., Si M.Y., Chen Y.H., Zhang N.L., Zhou M., Liao Q., Shi D.Q., Liu Y.N. Combination of biological pretreatment with NaOH/Urea pretreatment at cold temperature to enhance enzymatic hydrolysis of rice straw // *Bioresource Technology*. 2015. Vol. 198. P. 725-731.
86. Rabemanolontsoa H., Saka S. Various pretreatments of lignocellulosics // *Bioresource Technology*. 2016. Vol. 199. P. 83-91.
87. Reeb C., Phillips R., Venditti R., Treasure T., Daystar J., Gonzalez R., Jameel H., Kelley S. Techno-economic analysis of various biochemical conversion platforms for biosugar production: trade-offs of co-producing biopower versus pellets for either a greenfield, repurpose, or co-location siting context // *Bioproducts and Biorefining*. 2018. Vol. 12, № 3. P. 390-411.
88. Prior B.A., Day D.F. Hydrolysis of ammonia-pretreated sugar cane bagasse with cellulase, beta-glucosidase, and hemicellulase preparations // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2008. V. 146. P. 151-164.
89. Синицын А.П., Наджеми Б., Клесов А.А. Ферментативное получение глюкозы из целлюлозы: влияние ингибирования продуктами и изменение реакционной способности субстрата на скорость ферментативного гидролиза // *Прикладная биохимия и микробиология*. 1987. Т. 17. С. 315-321.
90. Марков А.В. Свойства ферментных комплексов, продуцируемых мутантными штаммами *Trichoderma reesei*. Москва: МГУ. 2003. 201 стр. Диссертация на соискание ученой степени канд. хим. наук: 02.00.15. Моск. гос. университет, Москва, 2003, 201 с.
91. Кастельянос О., Ермолова О.В., Синицын А.П., Попова Н.Н., Окунев О.Н., Кернс Г., Куде Е. Схема очистки ферментов целлюлазного комплекса *Penicillium verruculosum*, исследование их биохимических свойств и специфичности // *Биохимия*. 1995. Т. 60, № 6. С. 925-943.
92. Гутиеррес Родригес Б. Каталитические, биохимические и биотехнологические свойства эндоглюканазы В4 целлюлазного комплекса *Penicillium verruculosum*. Диссертация на соискание ученой степени канд. хим. наук: 02.00.15. Моск. гос. университет, Москва, 1997, 116 с.
93. Зоров И.Н. Исследование целлобиогидролазы и целлобиазы целлюлазного комплекса *Penicillium verruculosum*. Диссертация на соискание ученой степени канд. хим. наук: 02.0015, 03.00.04. Моск. гос. университет, Москва, 1997, 156 с.

94. Сахаров И.Ю., Зоров И.Н., Сеницын А.П. Выделение эндоглюканазы *Penicillium verruculosum* методом иммуноафинной хроматографии // Биохимия, 1996, Т. 61, № 9. С. 1658-1663.
95. Скомаровский А.А. Компонентный состав и гидролитическая способность ферментного комплекса *Penicillium verruculosum*. Диссертация на соискание ученой степени канд. хим. наук: 02.00.15. Моск. гос. университет, Москва, 2006, 176 с.
96. Морозова В.В. Свойства целлюлолитических ферментов *Penicillium verruculosum* и их применение для осахаривания лигноцеллюлозного сырья. Диссертация на соискание ученой степени канд. хим. наук: 02.00.15. Моск. гос. университет, Москва, 2009, 159 с.
97. Quinlan R.J., Sweeney M.D., Leggio L.L., Otten H., Poulsen J.C.N., Johansen K.S., Krogh K.B.R.M., Jørgensen C.J., Tovborg M., Anthonsen A., Tryfona T., Walter C.P., Dupree P., Xu F., Davies G.J., Walton P.H. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011. Vol. 108, № 37. P. 15079-15084.
98. Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Horn S.J., Liu Z., Zhai H., Sørlie M., Eijsink V.G. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides // Science. 2010. V. 330, № 6001. P. 219-222.
99. Рабинович М.Л., Черноглазов В.М., Клесов А.А. Классификация целлюлаз, их распространенность, множественные формы и механизмы действия // Биоконверсия целлюлозы: микробиология и биохимия. Итоги науки и техники. Сер.: Биотехнология. М.: ВИНТИ, 1988. Т. 11. С. 8-149.
100. Clarke A.J. Biodegradation of cellulose: Enzymology and biotechnology. Lancaster: Technomic Publishing Company Inc. 1997. 272 p.
101. Gilkes N.R., Henrissat B., Kilburn D.G., Miller R.C., Warren R.A.J. Domains in microbial  $\beta$ -1,4-glycanases: sequence conservation, function and enzyme families // Microbiological Reviews. 1991. Vol. 55, № 2. P.303-315.
102. Langsford M.L., Singh G.B., Moser B., Miller R.C., Warren R.A.J., Kilburn D.G. Glycosylation of bacterial cellulases prevents proteolytic cleavage between functional domains // FEBS Letters. 1987. Vol. 225, № 1. P.163-167.
103. Nidetzky B., Steiner W., Claeysens M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: adsorptions of two cellobiohydrolases, two endoglucanases and their core proteins on filter paper and their relation to hydrolysis // Biochemical Journal. 1994. Vol. 303, № 3. P. 817-823.
104. Nevalainen H., Harrison M., Jardine D., Zachara N., Paloheimo M., Suominen P., Gooley A., Packer N. Glycosylation of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. In: Carbohydrases from *Trichoderma reesei* and other microorganisms: structures, biochemistry, genetics and applications Editors: Claeysens, M., Nerinckx, W., Piens, K. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 1998 P.

335-344.

105. Hui J.P.M., White T.C., Thibault P. Identification of glycan structure and glycosylation sites in cellobiohydrolase II and endoglucanases I and II from *Trichoderma reesei* // *Glycobiology*. 2002. Vol. 12, № 12. P. 837-849.
106. Maras M., De Bruyn A., Schraml J., Herdewijn P., Claeysens M., Fiers W., Contreras R. Structural characterization of N-linked oligosaccharides from cellobiohydrolase I secreted by the filamentous fungus *Trichoderma reesei* RUT C30 // *European Journal of Biochemistry*. 1997, Vol. 245, № 3. P. 617-625.
107. Harrison M.J., Nouwens A.S., Jardine D.R., Zachara N.E., Gooley A.A., Nevalainen H., Packer N.H. Modified glycosylation of cellobiohydrolase I from a high cellulase-producing mutant strain of *Trichoderma reesei* // *European Journal of Biochemistry*. 1998. Vol. 256, № 1. P. 119-127.
108. Garcia R., Cremata J.A., Quintero O., Montesino R., Benkestock K., Stahlberg J. Characterization of protein glycoforms with N-linked neutral and phosphorylated oligosaccharides: studies on the glycosylation of endoglucanase I (Cel7B) from *Thichoderma reesei* // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2001. Vol. 33, № 2. P. 141-152.
109. Stals I., Sandra K., Devreese B., van Beeumen J., Claeysens M. Factors influencing glycosylation of *Thichoderma reesei* cellulases. II. N-glycosylation of Cel7A core protein isolated from different strains. *Glycobiology*, 2004, Vol. 14, № 8. P. 725-737.
110. Claeysens M., van Tilbeurgh H., Kamerling P., Berg J., Vrsanska M., Biely P. Studies of the cellulolytic system of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* QM 9414. Substrate specificity and transfer activity of endoglucanase I // *Journal Biochemical*. 1990. V. 270, № 1. P. 251-256.
111. Wong Y., Fincher G.B., McLachlan G.M. Kinetic properties and substrate specificities of two cellulases from auxin-treated Pea Epicotyls // *Journal of Biological Chemistry*. 1977. V. 252, № 4. P. 1402-1407.
112. Клесов А.А., Рабинович М.Л., Сеницын А.П., Чурилова И.В., Григораш С.Ю. Ферментативный гидролиз целлюлозы. II. Свойства компонентов целлюлазных комплексов из различных источников // *Биоорганическая химия*. 1980. Т. 6. С. 1225-1241.
113. Nystrom J.M., Andren R.K., Allen A.L. Enzymatic hydrolysis of cellulosic waste: the status of process technology and economic assessment // *American Institute of Chemical Engineers Symposium series*. 1978. V. 74, № 74. P. 82-88.
114. Vlasenko, E., Schülein, M., Cherry, J., Xu, F. Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases // *Bioresource Technology*. 2010. Vol. 101, № 7. P.2405-2411.
115. Van Petegem F., Vandenberghe I., Bhat M.K., Van Beeumen J. Atomic resolution structure of the major endoglucanase from *Thermoascus aurantiacus* // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002. V. 296, № 1. P. 161-166.

116. Lo Leggio L., Larsen S. The 1.62 Å structure of *Thermoascus aurantiacus* endoglucanase: completing the structural picture of subfamilies in glycoside hydrolase family 5 // FEBS Letters. 2002. Vol. 523, № 1. P. 103-108.
117. Hong J., Tamaki H., Yamamoto K., Kumagai H. Cloning of a gene encoding a thermo-stable endo-β-1,4-glucanase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast // Biotechnology Letters. 2003. Vol. 25. P. 657-661.
118. Zhao G., Yao Y., Hou L., Wang C., Cao X. Draft genome sequence of *Aspergillus oryzae* 100-8, an increased acid protease production strain // Genome Announcement. 2014. Vol. 2, № 3. P. 00548-14.
119. Hara Y., Hinoki Y., Shimoi H., Ito K. Cloning and sequence analysis of endoglucanase genes from an industrial fungus, *Aspergillus kawachii* // Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 2003. Vol. 67, № 9. P. 2010-2013.
120. Parry N.J., Beever D.E., Owen E., Nerinckx W., Claeysens M., Van Beeumen J., Bhat M.K. Biochemical characterization and mode of action of a thermostable endoglucanase purified from *Thermoascus aurantiacus* // Archives of Biochemistry and Biophysics. 2002. Vol. 404, № 2. P. 243-253.
121. Song X., Zhang S., Wang Y., Li J., He C., Yao L. A kinetic study of *Trichoderma reesei* Cel7B catalyzed cellulose hydrolysis // Enzyme and Microbial Technology. 2016. Vol. 87-88. P. 9-16.
122. Biely P., Vrsanská M., Claeysens M. The endo-1,4-β-glucanase I from *Trichoderma reesei*. Action on β-1,4-oligomers and polymers derived from D-glucose and D-xylose // European Journal of Biochemistry. 1991. Vol. 200, № 1. P. 157-163.
123. Niku-Paavola M.-L., Lappalainen A., Enary T.-M., Nummi M. A new appraisal of the endoglucanases of the fungus *Trichoderma reesei* // Biochemical Journal. 1985. Vol. 231, № 1. P. 75-81.
124. Kleywegt G.J., Zou J.Y., Divne C., Davies G.J., Sinning I., Stahlberg J., Reinikainen T., Srisodsuk M., Teeri T.T., Jones T.A. The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes // Journal of Molecular Biology. 1997. Vol. 272, № 3. P. 383-397.
125. Sukumaran R.K., Singhania R.R., Mathew G.M. Mathew P.A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production // Renewable Energy. 2009. Vol. 34, № 2. P. 421-424.
126. Teeri T.T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases // Trends in Biotechnol. 1997. Vol. 15, № 5. P. 160-167.
127. Bommarius A.S., Sohn M., Kang Y., Lee J.H., Realff M.J. Protein engineering of cellulases // Current Opinion in Biotechnology. 2014. Vol. 29. P. 139-145.
128. Jeoh T., Michener W., Himmel M.E., Decker S.R., Adney W.S. Implications of cellobiohydrolase

glycosylation for use in biomass conversion // *Biotechnology for Biofuels*. 2008. Vol. 1, № 10. P. 10-22.

129. Munoz I.G., Ubhayasekera W., Henriksson H., Szabo I., Pettersson G., Johansson G., Mowbray S.L., Ståhlberg J. Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CBH58) at 1.32 angstrom resolution and homology models of the isozymes // *Journal of Molecular Biology*. 2001. Vol. 314, № 5. P.1097-1111.

130. Van Tilbeurgh H., Tomme P., Claeysens M., Bhikhabhai R., Pettersson G. Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*: Separation of the functional domains // *FEBS Letters*. 1986. Vol. 204, № 2. P. 223-227.

131. Vrsanska M., Biely P. The cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* QM 9414: action on celooligosaccharides // *Carbohydrate Research*. 1992. Vol. 227, P. 19-27.

132. Konstantinidis A.K., Marsden I., Sinnott M.L. Hydrolyses of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cellobiosyl fluorides by cellobiohydrolases of *Trichoderma reesei* // *Biochemical Journal*. 1993. Vol. 291, № 3. P. 883-888.

133. Claeysens M., van Tilbeurgh H., Tomme P., Wood T.M., McCrae S.I. Fungal cellulase systems. Comparison of the specificities of the cellobiohydrolases isolated from *Penicillium pinophilum* and *Trichoderma reesei* // *Biochemical Journal*. 1989, Vol.261, № 3. P. 819-825.

134. Rouvinen J., Bergfors T., Teeri T., Knowles J.K.C., Jones T.A. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei* // *Science*. 1990. Vol. 249, № 4967. P. 380-386.

135. Divne C., Ståhlberg C., Reinikainen T., Ruohonen L., Pettersson G., Knowles J.K.C., Teeri T.T., Jones T.A. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* // *Science*. 1994. Vol. 265, № 5171. P. 524-528.

136. Boisset C., Frasnichini C., Schülein M., Henrissat B., Chanzy H. Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A // *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. Vol. 66, № 4. P.1444-1452.

137. Рабинович М.Л., Мельник М.С., Болобова А.В. Структура и механизм действия целлюлолитических ферментов // *Биохимия*. 2002. Т. 67, № 8. С. 1026-1050.

138. Linder M., Teeri T.T. The roles and function of cellulose-binding domains // *Journal of Biotechnology*. 1997. Vol. 57, № 1. P. 15-28.

139. Chundawat S.P.S, Bellesia G., Uppugundla N., Sousa L.C., Gao D., Cheh A.M., Agarwal U.P., Bianchetti C.M., Phillips G.N.J., Langan P., Balan V., Gnanakaran S., Dale B.E. Restructuring the crystalline cellulose hydrogen bond network enhances its depolymerization rate // *Journal of American Chemical Society*. 2011. Vol. 133, № 29. P. 11163-11174.

140. Tuohy M.G., Walsh D.J., Murray P.G., Claeysens M., Cuffe M.M., Savage A.V., Coughlan M.P. Kinetic parameters and mode of action of the cellobiohydrolases produced by *Talaromyces emersonii* //

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology. 2002. Vol. 1596, № 2. P. 366-380.

141. Tomme P., Clayssens M. Identification of a functionally important carboxyl group in cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* // FEBS Letters. 1989., Vol. 243, № 2. P. 239-243.

142. Divne C., Staahlberg J., Teeri T.T., Jones T.A. High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* // Journal of Molecular Biology. 1998. Vol. 275, № 2. P. 309-325.

143. Hanif A., Yasmeeen A., Rajoka M.I. Induction, production, repression, and derepression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger* // Bioresource Technology., 2004., V. 94., P. 311-319.

144. Texier H., Dumon C., Neugnot-Roux V., Maestracci M., O'Donohue M.J. Redefining XynA from *Penicillium funiculosum* IMI 378536 as a GH7 cellobiohydrolase // Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology., 2012., Vol. 39., P. 1569-1576.

145. Zou J., Kleywegt G.J., Ståhlberg J., Driguez H., Nerinckx W., Claeysens M., Koivula A., Teeri T.T., Jones T.A. Crystallographic evidence for substrate ring distortion and protein conformational changes during catalysis in cellobiohydrolase Cel6A from *Trichoderma reesei* // Structure. 1999. Vol. 7, № 9. P. 1035-1045.

146. Futagami T., Mori K., Yamashita A., Wada S., Kajiwara Y., Takashita H., Omori T., Takegawa K., Tashiro K., Kuhara S., Goto M. Genome sequence of the white koji mold *Aspergillus kawachii* IFO 4308, used for brewing the Japanese distilled spirit shochu // Eukaryotic Cell. 2011. Vol. 10, № 11. P. 1586-1587.

147. Koivula A., Reinikainen T., Ruohonen L., Valkeajaervi A., Claeysens M., Teleman O., Kleywegt G.J., Szardenings M., Rouvinen J., Jones T.A., Teeri T.T. The active site of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II: the role of tyrosine 169 // Protein Engineering. 1996. Vol. 9, № 8. P. 691-699.

148. Woodward J. Fungal and other  $\beta$ -D-glucosidases – their properties and applications // Enzyme and Microbial Technology. 1982. Vol. 4, № 2. P. 73-79.

149. Chen H., Hayn M., Esterbauer H. Purification and characterization of two extracellular  $\beta$ -glucosidases from *Trichoderma reesei* // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology. 1992. Vol. 1121, № 1. P. 54-60.

150. Umile C., Kubicek C.P. A constitutive, plasma-membrane bound  $\beta$ -glucosidase in *Trichoderma reesei* // FEMS Microbiology Letters. 1986, Vol. 34, № 3. P. 291-295.

151. Contreras F., Pramanik S., Rozhkova A.M., Zorov I.N., Korotkova O.G., Sinitsyn A.P., Schwaneberg U., Davari M.D. Engineering robust cellulases for tailored lignocellulosic degradation cocktails // International Journal of Molecular Sciences. 2020. Vol. 21, № 5. P. 1589.

152. Hemsworth G.R., Henrissat B., Davies G.J., Walton P.H. Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide mono-oxygenases // Nature Chemical Biology. 2013, Vol. 10. P. 122-126.

153. Vu V.V., Beeson W.T., Phillips C.M., Cate J.H., Marletta M.A. Determinants of Regioselective Hydroxylation in the Fungal Polysaccharide Monooxygenase // *Journal of the American Chemical Society*. 2014, Vol. 136, № 2. P. 562–565.
154. Zifcalkova L, Baldrian P. Fungal polysaccharide monooxygenases: new players in the decomposition of cellulose // *Fungal Ecology*. 2012. No. 5. P. 481-489.
155. Raguz S., Yagüe E., Wood D.A., Thurston C.F. Isolation and characterization of a cellulose-growth-specific gene from *Agaricus bisporus* // *Gene*. 1992. Vol. 1, № 2. P. 183-190.
156. Moon M., Lee J.P., Park G.W., Lee J.S., Park H.J., Min K. Lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO)-derived saccharification of lignocellulosic biomass // *Bioresource Technology*. 2022. Vol. 359. P. 127501.
157. Cannella D., Weiss N., Hsieh C., Magri S., Zarattini M., Kuska J., Karuna N., Thygesen L.G., Polikarpov I., Felby C., Jeoh T., Jørgensen H. LPMO-mediated oxidation increases cellulose wettability, surface water retention and hydrolysis yield at high dry matter // *Cellulose*. 2023. Vol. 30. P. 6259–6272
158. Jeoh T., Wilson D.B., Walker L.P. Effect of cellulase mole fraction and cellulose recalcitrance on synergism in cellulose hydrolysis and binding // *Biotechnology Progress*. 2006. Vol. 22, № 1. P. 270-277.
159. Короткова О.Г., Семенова М.В., Морозова В.В., Зоров И.Н., Соколова Л.М., Сеницын А.П. Выделение и свойства грибных  $\beta$ -глюкозидаз // *Биохимия*. 2009. Т. 74, № 5. С. 699-709.
160. Dotsenko G.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Korotkova O.G., Sinitsyn A.P. Heterologous  $\beta$ -glucosidase in a fungal cellulase system: comparison of different methods for development of multienzyme cocktails // *Process Biochemistry*. 2015. Vol. 50, № 8. P. 1258-1263.
161. Семёнова М.В., Рожкова А.М., Осипов Д.О., Сатрутдинов А.Д., Сеницына О.А., Рубцова Е.А., Кондратьева Е.Г., Сеницын А.П. Подбор оптимального комплекса ферментов для гидролиза углеводов свекловичного жома // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2019. Т. 55, № 6. С. 586–593.
162. Illanes A., Cauerhff A., Wilson L., Castro G.R. Recent trends in biocatalysis engineering // *Bioresource Technology*. 2012. Vol. 115. P. 48-57.
163. *Bioprocessing of renewable resources to commodity bioproducts, First edition / Edited by Bisaria V.S. and Kondo A. John Wiley & Sons, Inc, 2014. 584 p.*
164. Chen H. *Lignocellulose Biorefinery Engineering. Principles and Applications. Woodhead Publishing Series in Energy: Number 74. Amsterdam: Elsevier. 2015. 274 p.*
165. Mathew G.M., Sukumaran R.K., Singhania R.R., Padley A. Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation // *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2008. Vol. 67, № 11. P. 898-907.
166. Vieille C., Zeikus G.J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for

- thermostability // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2001. Vol. 65, № 1. P. 1-43.
167. Alma'abadi A.D., Gojobori T., Mineta K. Marine metagenome as a resource for novel enzymes // *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015. Vol. 13, № 5. P. 290-295.
168. Sinitsyn, A., Korotkova, O., Sinitsyna, O., Rozhkova, A., Dotsenko, G., Proskurina, O., Osipov, D., Kondrat'eva, E., Chekushina, A. Optimizing the composition of cellulase enzyme complex from *Penicillium verruculosum*: enhancing hydrolytic capabilities via genetic engineering // *Catalysis in Industry*. 2016. Vol. 8 P. 101-106.
169. Синицын А.П., Осипов Д.О., Цурикова Н.В., Великорецкая И.А., Шашков И.А., Зверев С.В. Возможности использования оболочек белого люпина и сои в биотехнологии // *Биотехнология*. 2016. Т. 32, № 3. С. 27-36.
170. Синицын А.П., Синицына О.А., Зоров И.Н., Рожкова А.М. Возможности экспрессионной системы гриба *Penicillium verruculosum* для получения продуцентов ферментов, обеспечивающих эффективную деструкцию возобновляемой растительной биомассы (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2020. Т. 56, № 6. С. 1-10.
171. Синицын А.П., Короткова О.Г., Синицына О.А., Рожкова А.М., Проскурина О.В., Осипов Д.О., Кондратьева Е., Чекушина А.В. Оптимизация состава целлюлазного ферментного комплекса *Penicillium verruculosum*: увеличение гидролитической способности с помощью методов генетической инженерии // *Катализ в промышленности*. 2015. Т. 15, № 6. С. 78-83.
172. Синицын А.П., Осипов Д.О., Рожкова А.М., Бушина Е.В., Доценко Г.С., Синицына О.А., Кондратьева Е.Г., Немашкалов В.А., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Окунев О.Н. Получение высокоэффективных ферментных комплексов целлюлаз и гемицеллюлаз для гидролиза растительного сырья на основе штамма *Penicillium verruculosum* // *Биотехнология*. 2013. № 5. С. 50-53.
173. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Manenkova J.A., Protas O.V. Enzymatic saccharification of industrial and agricultural lignocellulosic wastes // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1992. Vol. 34. P. 625-637.
174. Shen J., Agblevor F.A. Modeling semi-simultaneous saccharification and fermentation of ethanol production from cellulose // *Biomass and Bioenergy*. 2010. Vol. 34, № 8. P. 1098-1107.
175. Öhgren K., Bura R., Lesnicki G., Saddler J.N., Zacchi G. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover // *Process Biochemistry*. 2007. Vol. 42, № 5. P. 834-839.
176. Morales-Rodriguez R., Gernaey K.V., Meyer A.S., Sin G. A mathematical model for simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of C6 and C5 sugars // *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2011. Vol. 19, № 2. P. 185-191.
177. Ghost P., Pamment N.B., Martin W.R.B. Simultaneous saccharification and fermentation of

- cellulose: effect of  $\beta$ -D-glucosidase activity and ethanol inhibition of cellulases // *Enzyme and Microbial Technology*. 1982. Vol. 4, № 6. P. 425-430.
178. Davies G., Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases // *Structure*. 1995. Vol. 3, № 9. P. 853-859.
179. Tishkov V.I., Gusakov A.V., Cherkashina A.S., Sinitsyn A.P. Engineering the pH-optimum of activity of the GH12 family endoglucanase by site-directed mutagenesis // *Biochimie*. 2013. Vol. 95, № 9. P. 1704-1710.
180. Barati B., Sadegh Amiri I. In Silico Engineering of Disulphide Bonds to Produce Stable Cellulase. Singapore: Springer Briefs in Applied Sciences and Technology. 2015. 48 p.
181. Yu H., Huang H. Engineering proteins for thermostability through rigidifying flexible sites // *Biotechnology Advances*. 2014. Vol. 32, № 2. P. 308-315.
182. Eriksen D.T., Lian J., Zhao H. Protein design for pathway engineering // *Journal of Structural Biology*. 2014. Vol. 185, № 2. P. 234-242.
183. Juturu V., Wu J.C. Microbial cellulases: engineering, production and applications // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014. Vol. 33. P. 188-203.
184. Yoshihiro H., Tadaihiro O., Tooru K. Mutated alkaline cellulase. Applicants: KAO CORP. Пат. 7364891 CIIA, 2008.
185. St-Pierre P., Masri N., Fournier M.C., White T.C. Modified cellulases with increased thermostability, thermophilicity, and alkalophilicity. Пат. 8101398 CIIA, 2012.
186. Zhang Y.-H., Himmel M.E., Mielenz J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies // *Biotechnology Advances*. 2006. Vol. 24, № 5. P. 452-481.
187. Kim Y.S., Jung H.C., Pan J.G. Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulase variants // *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. Vol. 66, № 2. P. 788-793.
188. Endelman J.B., Silberg J.J., Wang Z.-G., Arnold F.H. Site-directed protein recombination as a shortest-path problem // *Protein Engineering, Design & Selection*. 2004. Vol. 17, № 7. P. 589-594.
189. Schülein, M. Protein engineering of cellulases // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000. Vol. 1543, № 2. P. 239-252.
190. Dombkowski A.A., Sultana K.Z., Craig D.B. Protein disulfide engineering // *FEBS Letters*. 2014. Vol. 588, № 2. P. 206-212.
191. Trudeau, D.L., Lee, T.M., Arnold, F.H. Engineered thermostable fungal cellulases exhibit efficient synergistic cellulose hydrolysis at elevated temperatures // *Biotechnology and Bioengineering*. 2014. Vol. 111, № 12. P. 2390-2397.
192. Zhang S., Wilson D.B. Surface residue mutations which change the substrate specificity of *Thermomonospora fusca* endoglucanase E2 // *Journal of Biotechnology*. 1997. Vol. 57, № 1. P. 101-

113.

193. Zhang S., Barr B.K., Wilson D.B. Effects of noncatalytic residue mutations on substrate specificity and ligand binding of *Thermobifida fusca* endocellulase cel6A // European Journal of Biochemistry. 2000. Vol. 267, № 1. P. 244-252.

194. Beckham G.T., Dai Z., Matthews J.F., Momany M., Payne C.M., Adney W.S., Baker S.E., Himmel M.E. Harnessing glycosylation to improve cellulase activity // Current Opinion in Biotechnology. 2012. Vol. 23, № 3. P. 338-345.

195. Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2013. Vol. 1833, № 11. P. 2430-2437.

196. Geysens S., Whyteside G., Archer D.B. Genomics of protein folding in the endoplasmic reticulum, secretion stress and glycosylation in the aspergilli // Fungal Genetics and Biology. 2009. Vol. 46, № 1. P. S121-S140.

197. Wei W., Chen L., Zou G., Wang Q., Yan X., Zhang J., Wang C., Zhou Z. N-Glycosylation affects the proper folding, enzymatic characteristics and production of a fungal  $\beta$ -glucosidase // Biotechnology and Bioengineering. 2013. Vol. 110, № 12. P. 3075-3084.

198. Wang W., Nema S., Teagarden D. Protein aggregation - pathways and influencing factors // International Journal of Pharmaceutics. 2010. Vol. 390, № 2. P. 89-99.

199. Culyba E.K., Price J.L., Hanson S.R., Dhar A., Wong C.H., Gruebele M., Powers E.T., Kelly J.W. Protein native-state stabilization by placing aromatic side chains in N-glycosylated reverse turns // Science. 2011. Vol. 331, № 6017. P. 571-575.

200. Beckham G.T., Ståhlberg J., Knott B.C., Himmel M.E., Crowley M.F., Sandgren M., Sørlie M., Payne C.M. Towards a molecular-level theory of carbohydrate processivity in glycoside hydrolases // Current Opinion in Biotechnology. 2014. Vol. 27. P. 96-106.

201. Hui J.P.M., Lanthier P., White T.C., McHugh S.G., Yaguchi M., Roy R., Thibault P. Characterization of cellobiohydrolase I (Cel7A) glycoforms from extracts of *Trichoderma reesei* using capillary isoelectric focusing and electrospray mass spectrometry // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 2001. Vol. 752, № 2. P. 349-368.

202. Gusakov A.V., Antonov A.I., Ustinov B.B. N-Glycosylation in *Chrysosporium lucknowense* enzymes // Carbohydrate Research. 2008. Vol. 343, № 1. P. 48-55.

203. Greene E.R., Himmel M.E., Beckham G.T., Tan Z. Glycosylation of cellulases: engineering better enzymes for biofuels // Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. 2015. Vol. 72., P. 63-112.

204. Deshpande N., Wilkins M.R., Packer N., Nevalainen H. Protein glycosylation pathways in filamentous fungi // Glycobiology. 2008. Vol. 18, № 8. P. 626-637

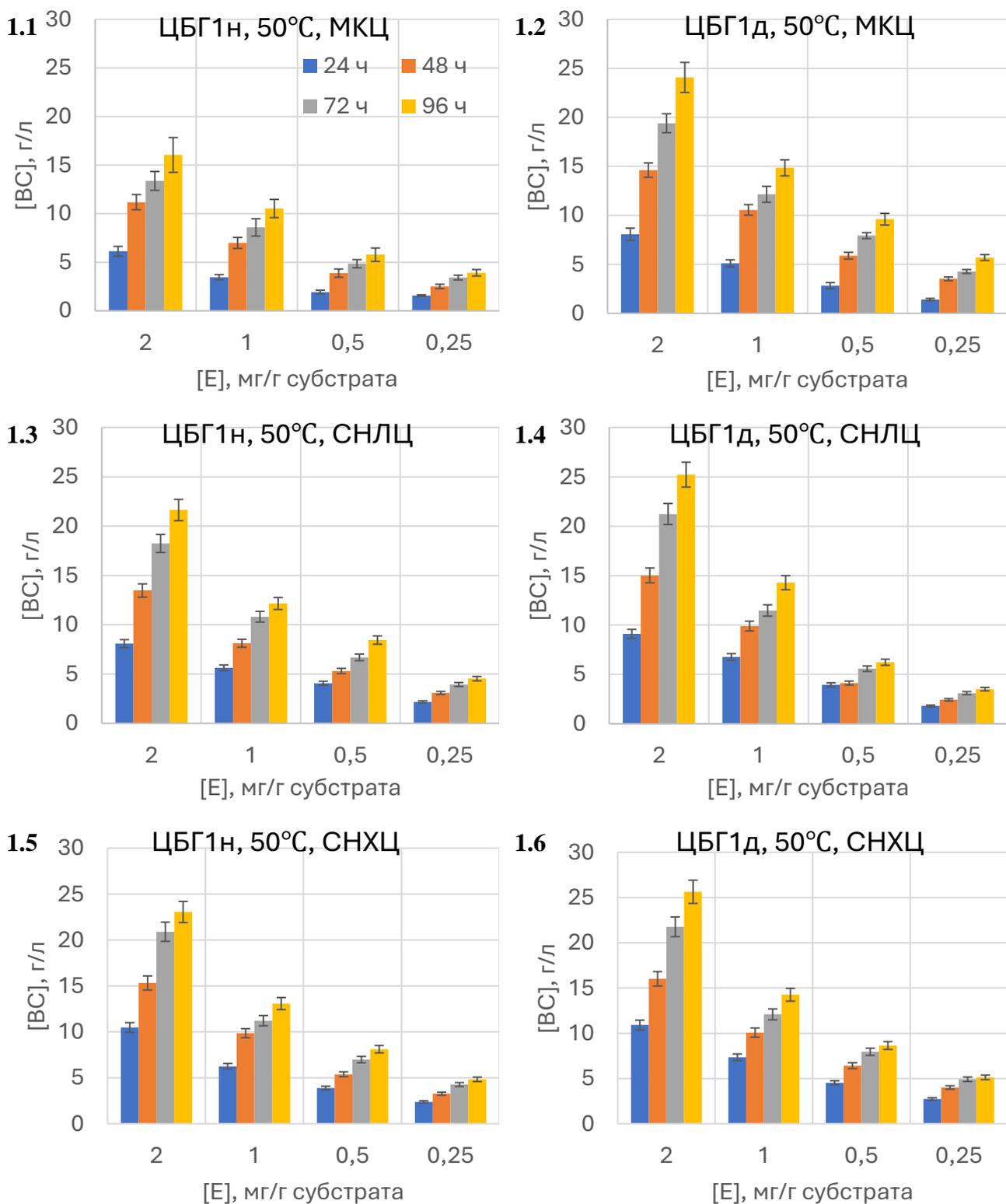
205. Voutilainen S.P., Murray P.G., Tuohy M.G., Koivula A. Expression of *Talaromyces emersonii*

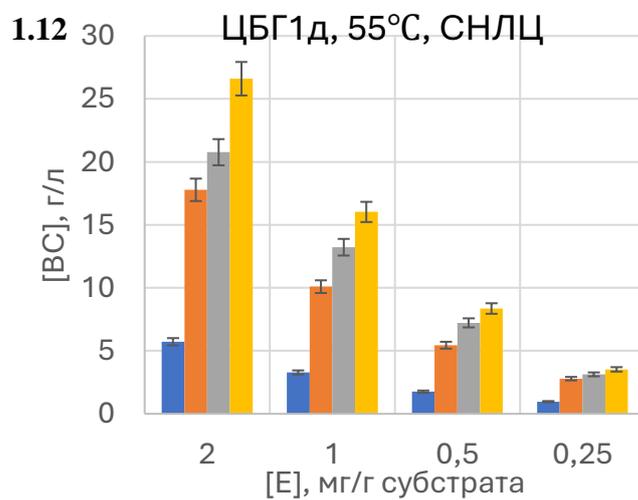
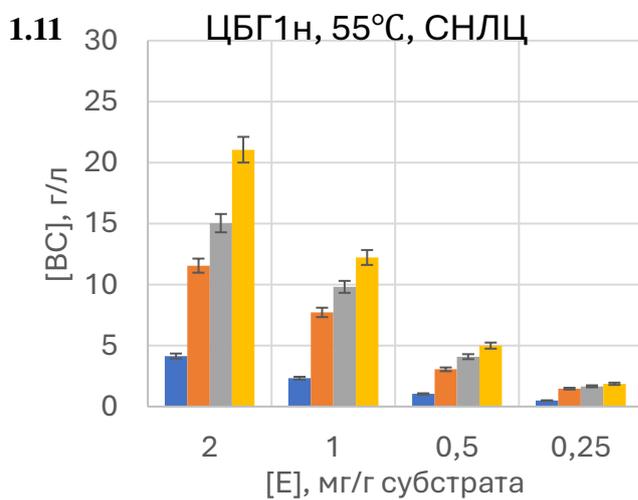
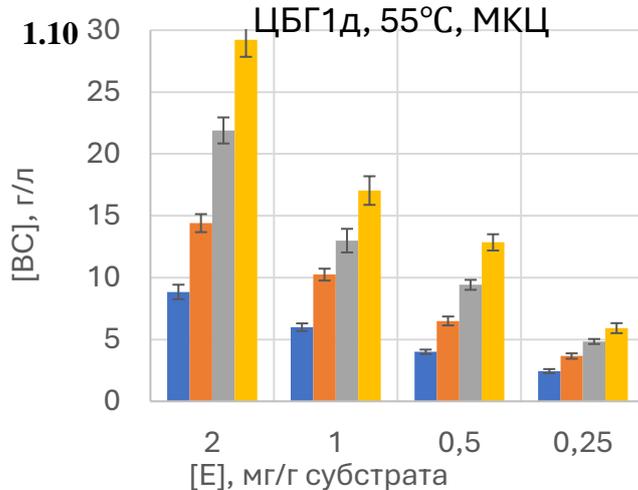
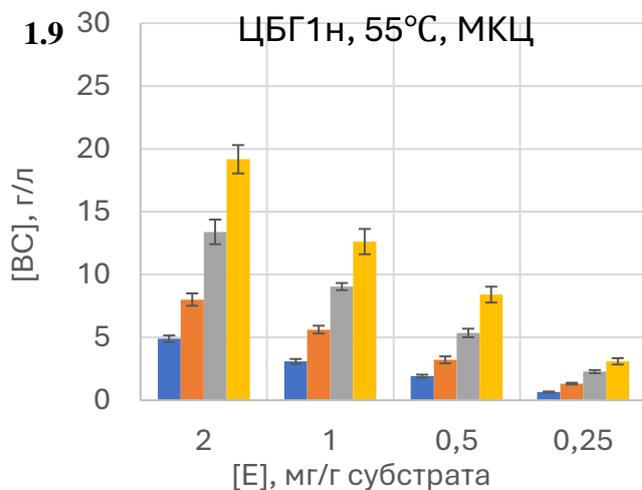
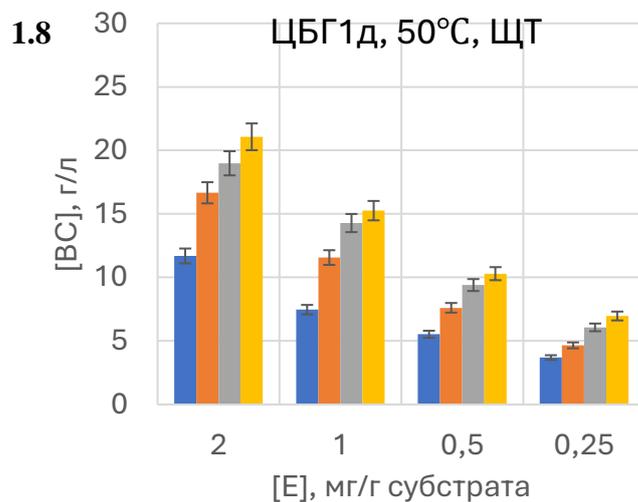
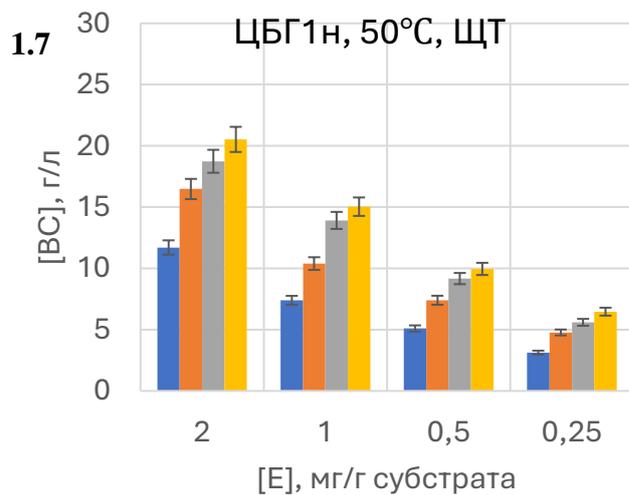
- cellobiohydrolase Cel7A in *Saccharomyces cerevisiae* and rational mutagenesis to improve its thermostability and activity // Protein Engineering, Design and Selection. 2010. Vol. 23, № 2. P. 69-79.
206. Adney W.S., Jeoh T., Beckham G.T., Chou Y.-C., Baker J.O., Michener W., Brunecky R., Himmel M.E. Probing the role of N-linked glycans in the stability and activity of fungal cellobiohydrolases by mutational analysis // Cellulose., 2009., V. 16., P. 699-709.
207. Dotsenko A.S., Gusakov A.V., Volkov P.V., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. N-Linked glycosylation of recombinant cellobiohydrolase I (Cel7A) from *Penicillium verruculosum* and its effect on the enzyme activity // Biotechnology and Bioengineering. 2016. Vol. 113, № 2. P. 283-291.
208. Dotsenko A.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Sinitsyna O.A., Nemashkalov V.A., Sinitsyn A.P. Effect of N-linked glycosylation on the activity and other properties of recombinant endoglucanase IIa (Cel5A) from *Penicillium verruculosum* // Protein Engineering, Design & Selections. 2016. Vol. 29, № 11. P. 495-501.
209. Gusakov, A.V., Dotsenko, A.S., Rozhkova, A.M., Sinitsyn, A.P. N-Linked glycans are an important component of the processive machinery of cellobiohydrolases // Biochimie. 2017. Vol. 132. P. 102-108.
210. Wood T.M. Preparation of crystalline, amorphous, and dyed cellulase substrates // Methods Enzymology. 1988. Vol. 160. P. 19-25.
211. Sinitsyna O.A., Bukhtoyarov F.E., Gusakov A.V., Okunev O.N., Bekkarevitch A.O., Vinetsky Y.P., Sinitsyn A.P. Isolation and properties of major components of *Penicillium canescens* extracellular enzyme complex // Biochemistry. 2003. Vol. 68. P. 1200-1209.
212. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Salanovich T.N., Bukhtoyarov F.E., Markov A.V., Ustinov B.B., van Zeijl C., Punt P., Burlingame R. Purification, cloning and characterisation of two forms of thermostable and highly active cellobiohydrolase I (Cel7A) produced by the industrial strain of *Chrysosporium lucknowense* // Enzyme and Microbial Technology. 2005. Vol. 36, № 1. P. 57-69.
213. Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов. Итоги науки и техники. Серия Биотехнология. М.: ВИНТИ. 1990. т 25. 152 с.
214. Breslmayr E., Hanzek M., Hanrahan A., Leitner C., Kittl R., Santek B., Oostenbrink C., Ludwig R. A fast and sensitive activity assay for lytic polysaccharide monoxygenase // Biotechnology for Biofuels and Bioproducts. 2018. Vol. 11, № 79.
215. Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Итоги науки и техники. Биотехнология. М.: Изд-во МГУ. 1993, Т. 25. 148 с.
216. Справочник биохимика. М.: Мир. 1991. 481 с.
217. Markov A.V., Gusakov A.V., Kondratyeva E.G., Okunev O.N., Bekkarevich A.O., Sinitsyn A.P. New effective method for analysis of the component composition of enzyme complexes from *Trichoderma reesei* // Biochemistry. 2005. Vol. 70. P. 657-663

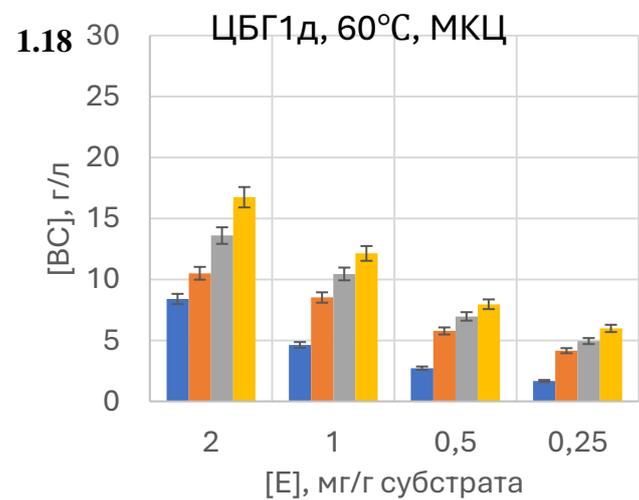
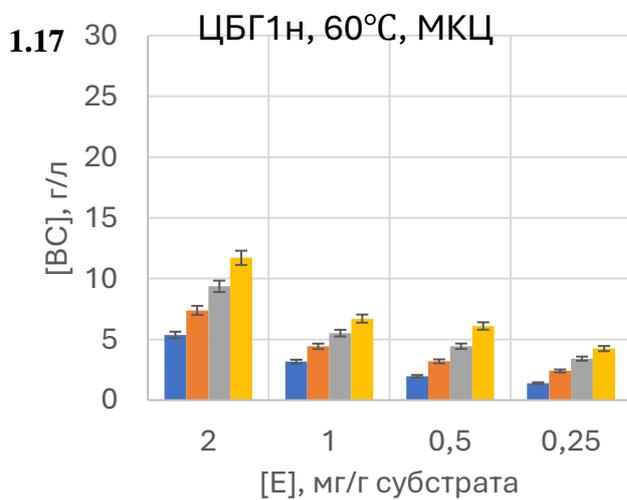
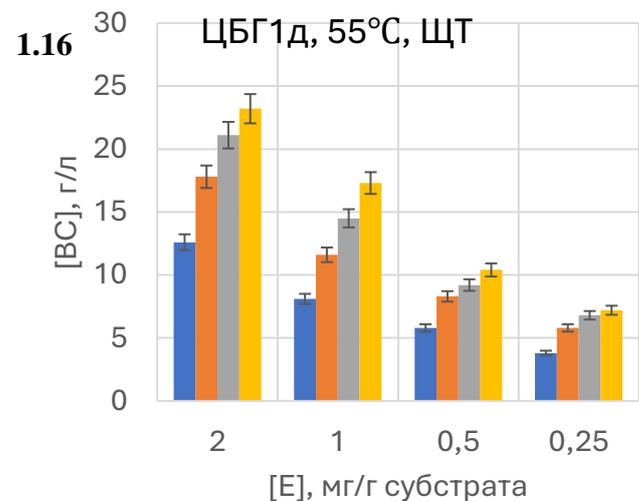
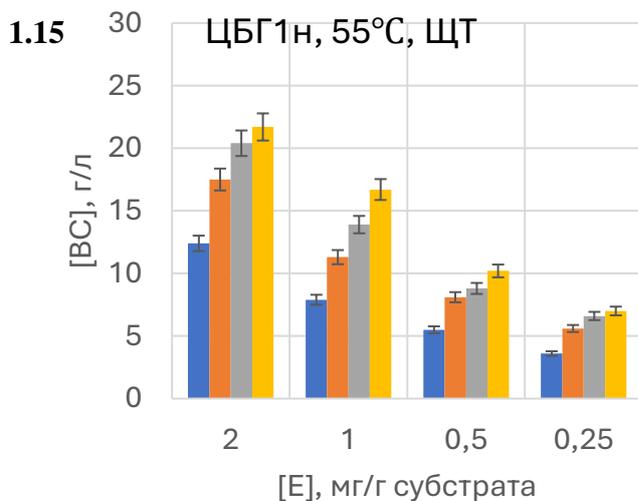
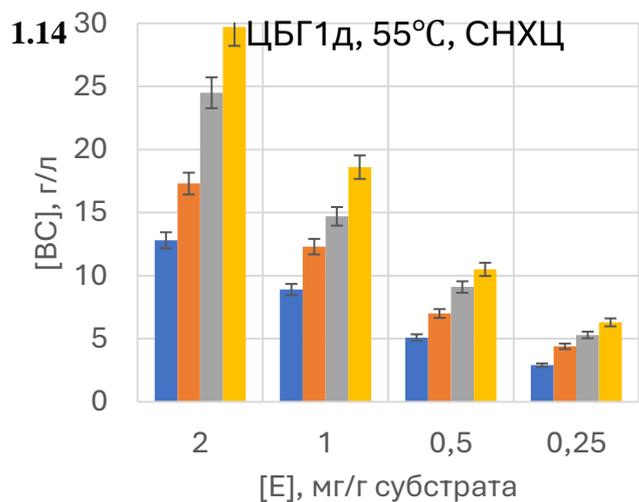
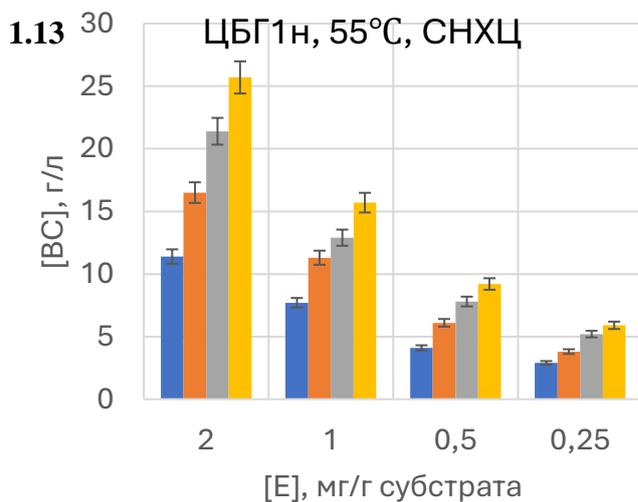
218. Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravilnikov A.G., Osipov D.O., Sinitsyn A.P. Cellulases of *Penicillium verruculosum* // Biotechnology Journal. 2010. Vol. 5, № 8. P. 871-880.
219. Gusakov A.V., Semenova M.V., Sinitsyn A.P. Mass spectrometry in the study of extracellular enzymes produced by filamentous fungi // Journal of Analytical Chemistry. 2010. Vol. 65. P. 1446-1461
220. Dotsenko A.S., Rozhkova A.M., Gusakov A.V. Properties and N-glycosylation of recombinant endoglucanase II from *Penicillium verruculosum* // Moscow University Chemistry Bulletin. 2015. Vol. 70. P. 283-286.
221. Телицин В.Д. Получение и изучение свойств полисахаридмонооксигеназы *Penicillium verruculosum*. дипломная работа. Моск. гос. Университет, Москва. 2020. 78 с.
222. Korotkova O.G., Semenova M.V., Morozova V.V., Zorov I.N., Sokolova L.M., Bubnova T.M., Okunev O.N, Sinitsyn A.P. Isolation and properties of fungal  $\beta$ -glucosidases // Biochemistry (Moscow). 2009. Vol. 74. P. 569-577.
223. Semenova M.V., Gusakov A.V., Telitsin V.D., Rozhkova A.M., Kondratyeva E.G., Sinitsyn A.P. Purification and characterization of two forms of the homologously expressed lytic polysaccharide monoxygenase (PvLPMO9A) from *Penicillium verruculosum* // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 2020. Vol. 1868, №. 1. P. 140297.

## Приложения

### Приложение 1. Гидролиз ЦСС индивидуальными ферментами (к Главе 6)







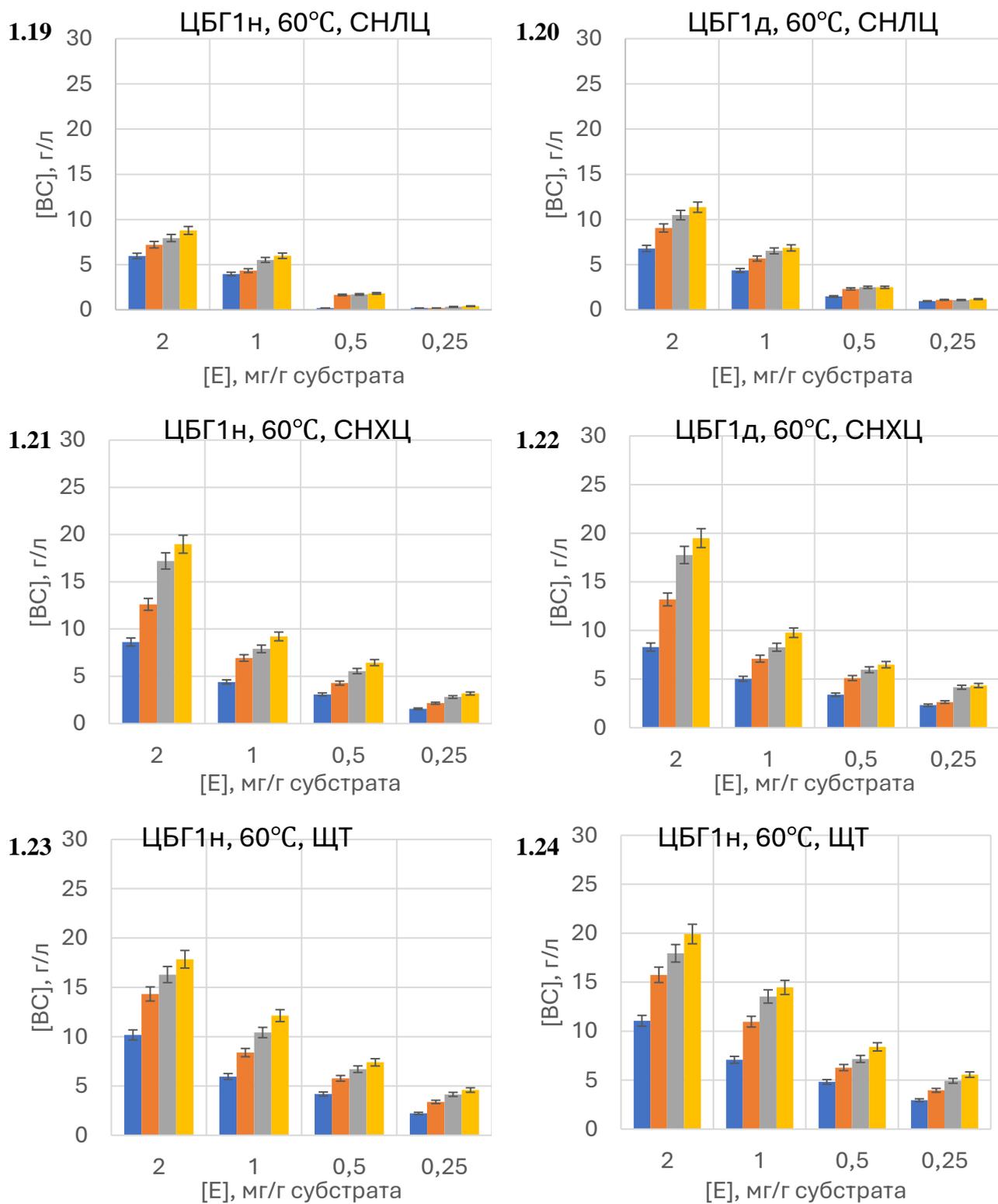
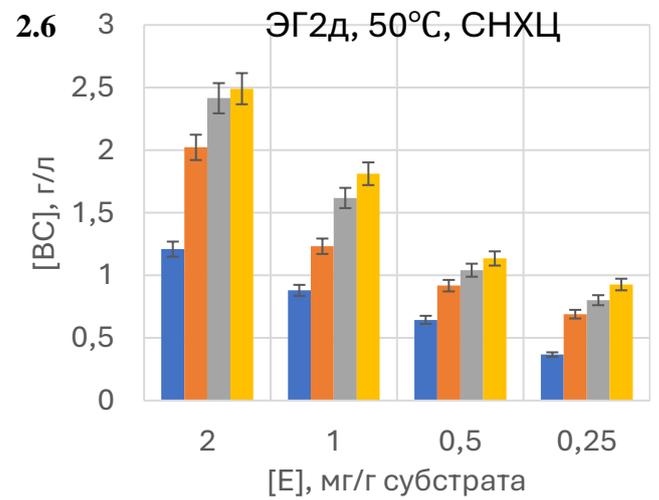
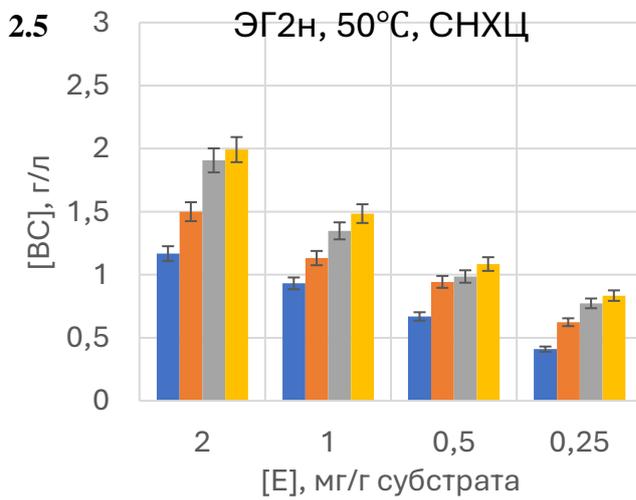
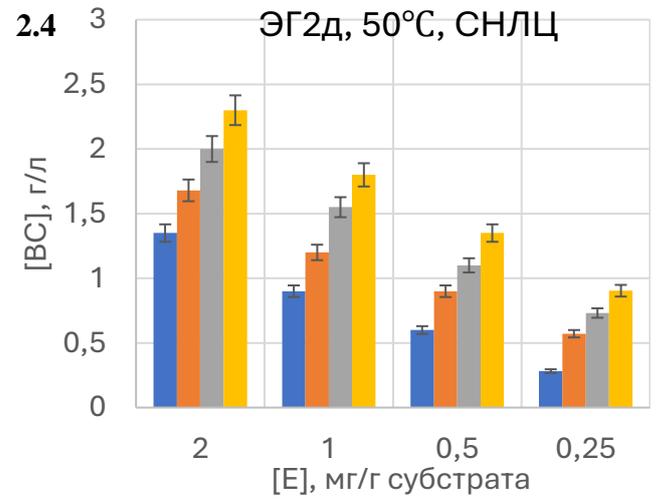
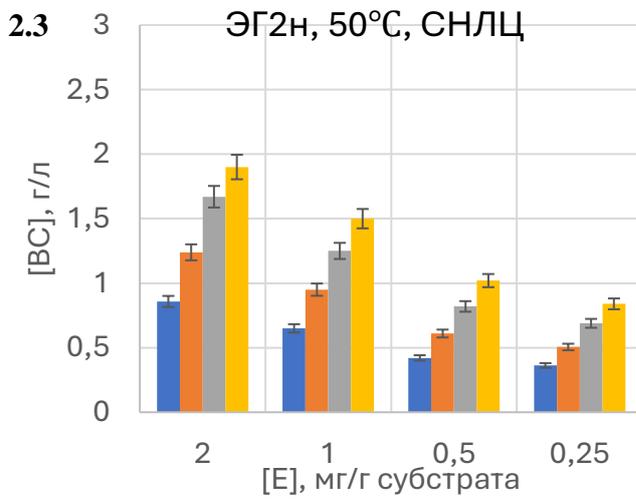
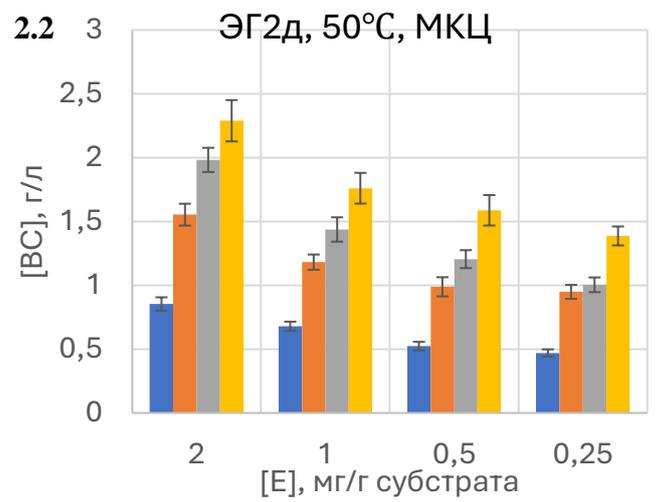
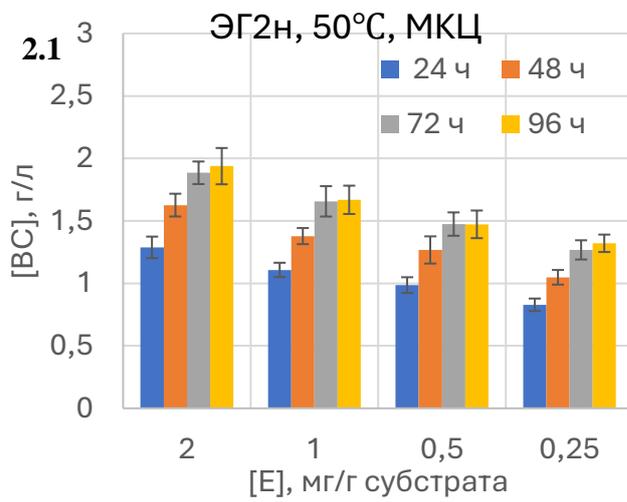
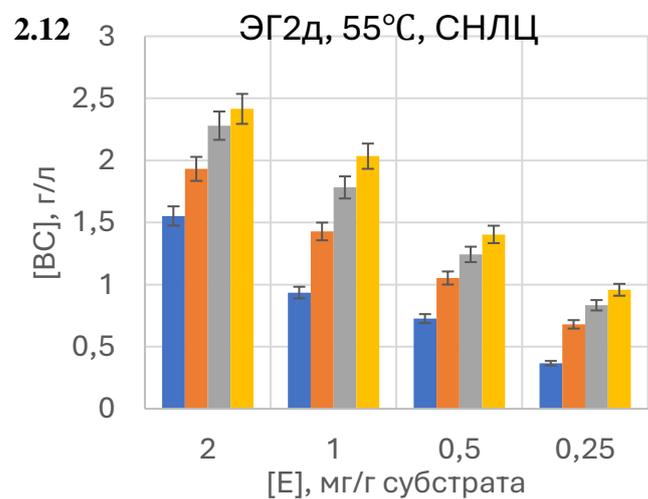
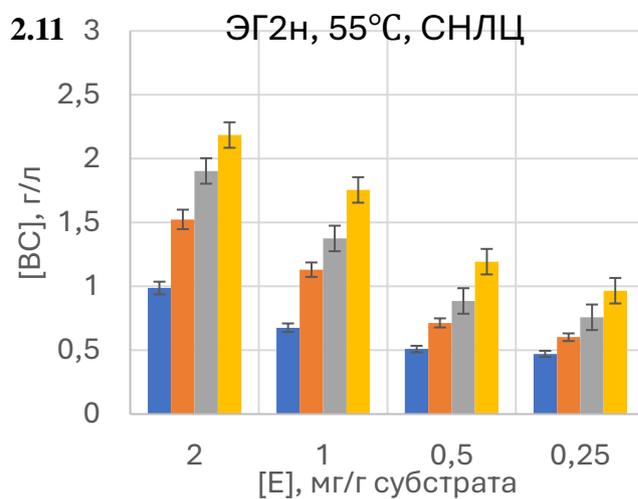
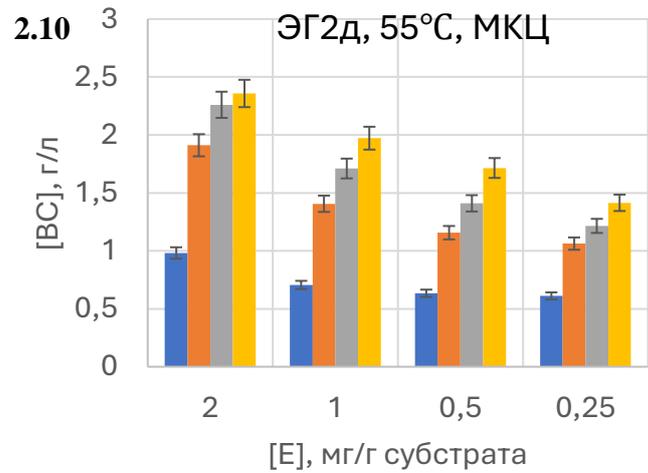
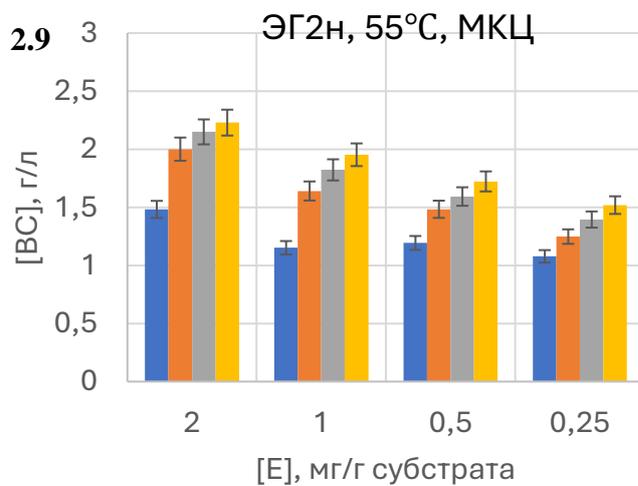
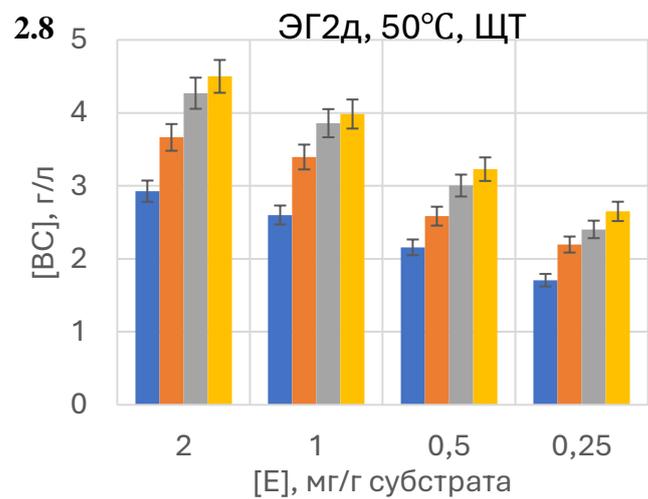
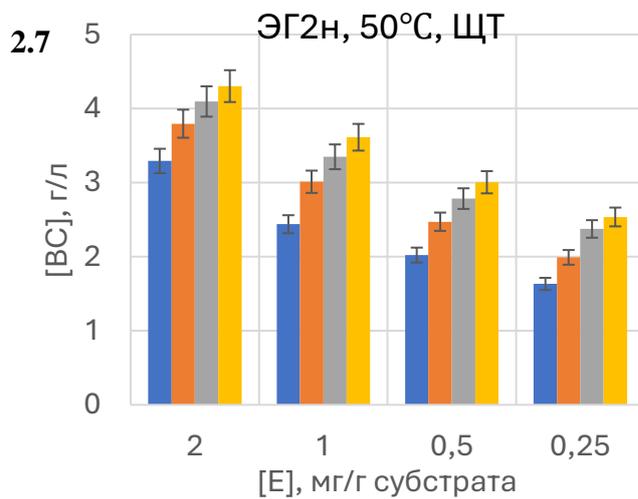
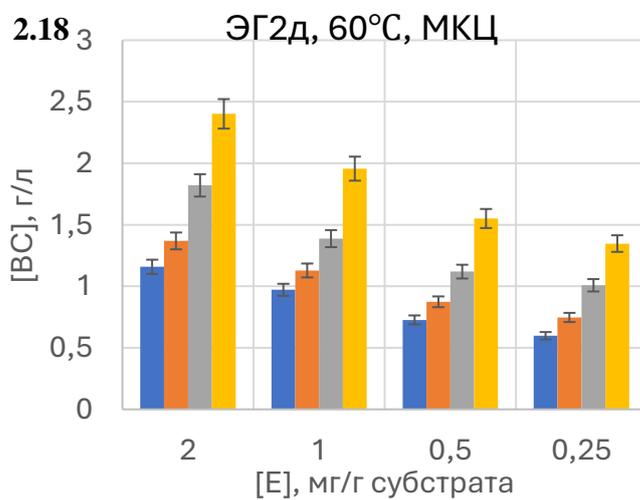
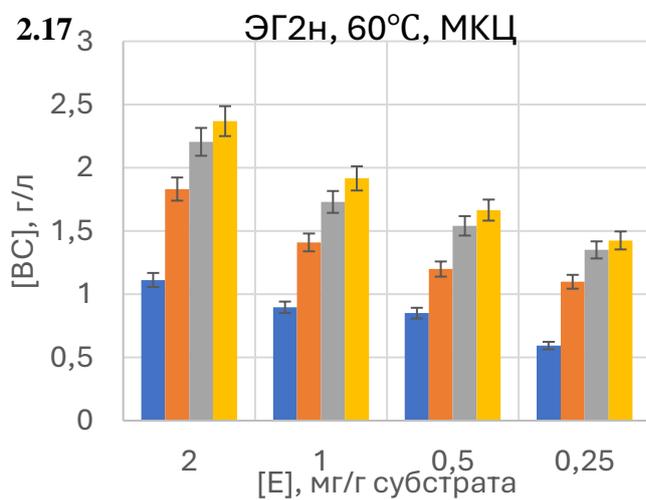
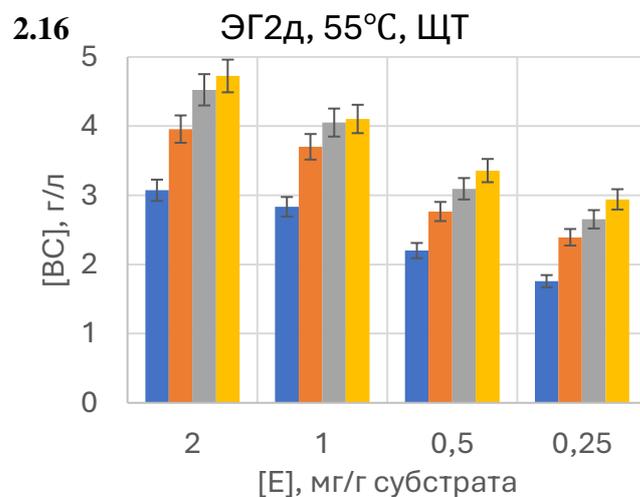
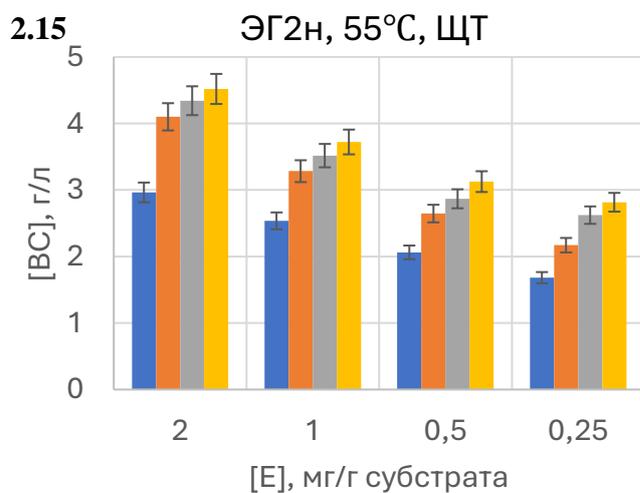
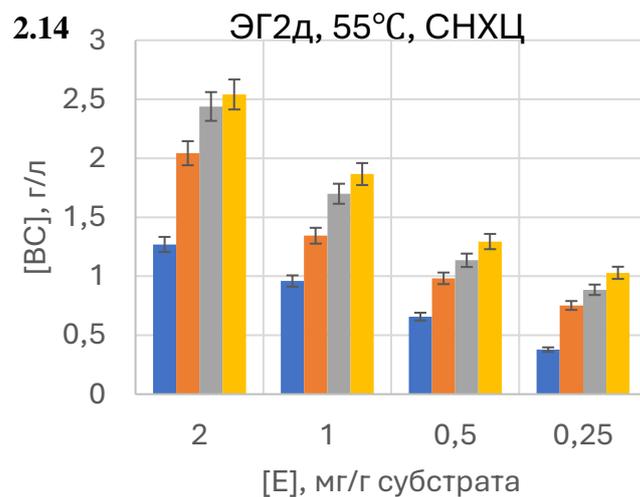
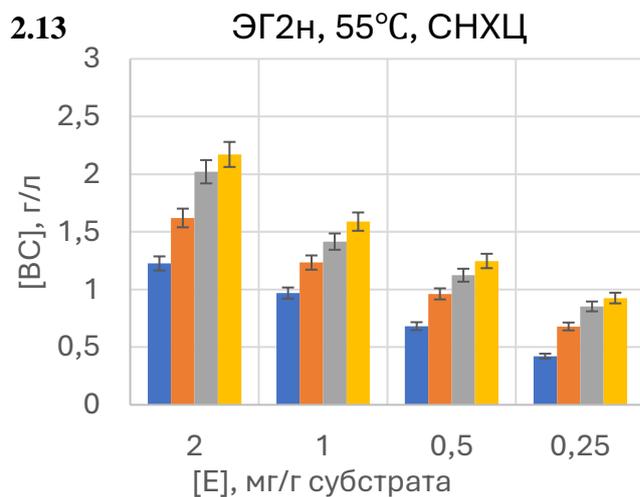


Рисунок 1.1–1.24. Изменение концентрации ВС в ходе гидролиза МКЦ, СНЛЦ, СНХЦ и ЩТ при различных дозировках ЦБГ1н или ЦБГ1д и различных температурах, pH 5,0.







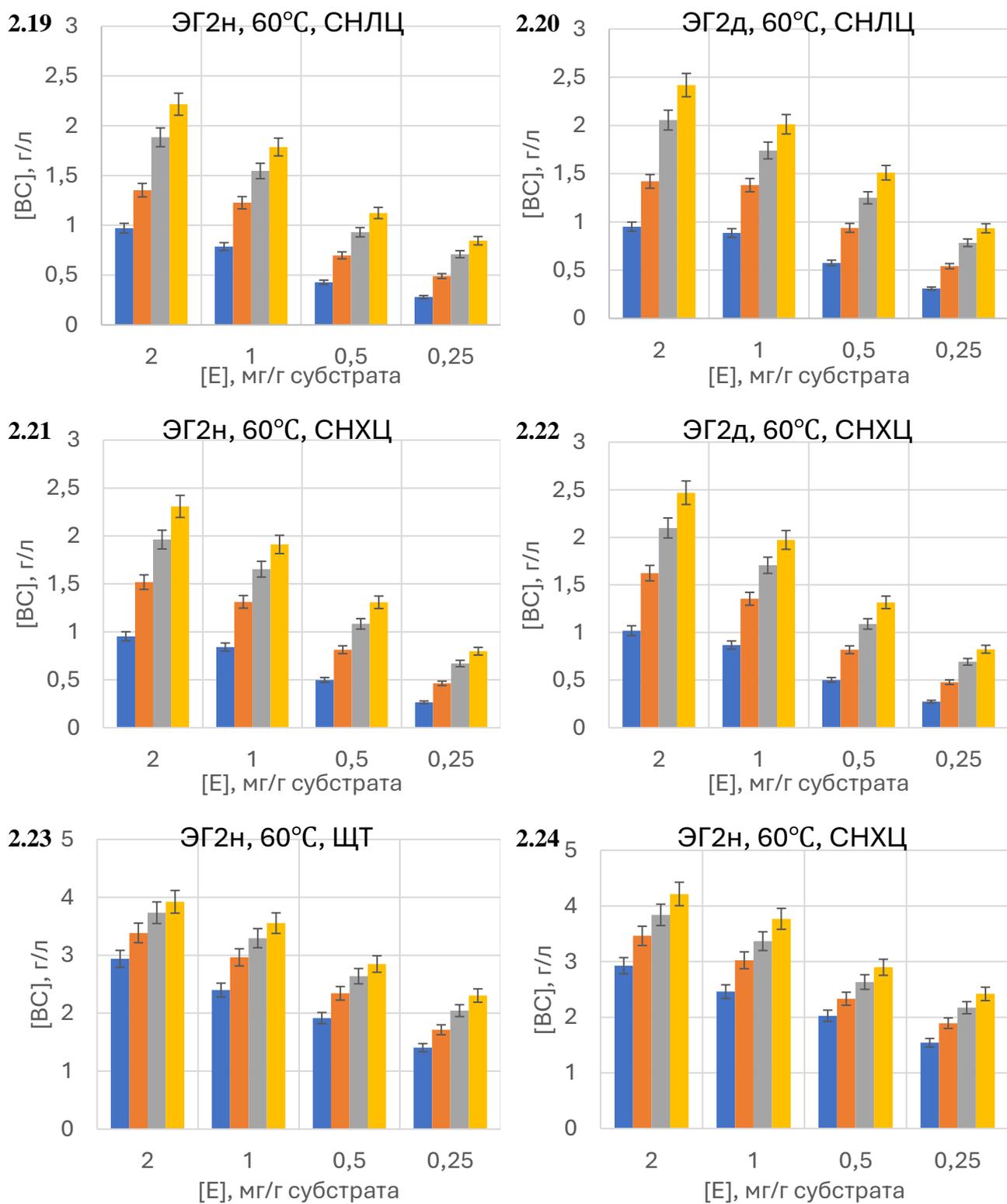
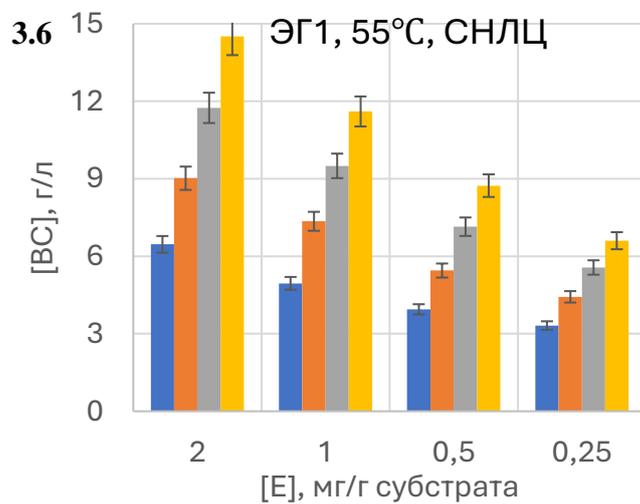
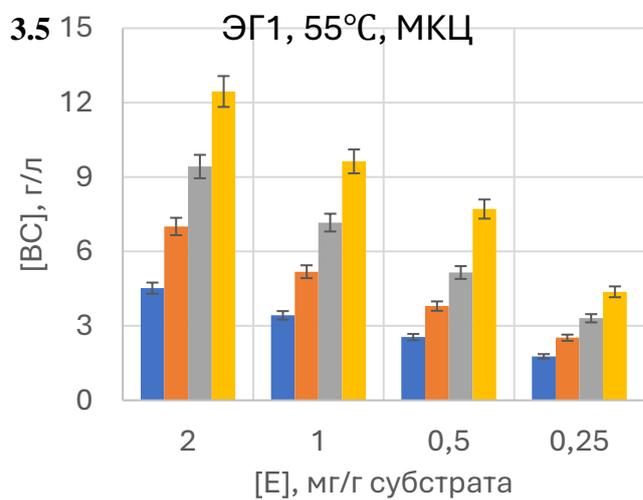
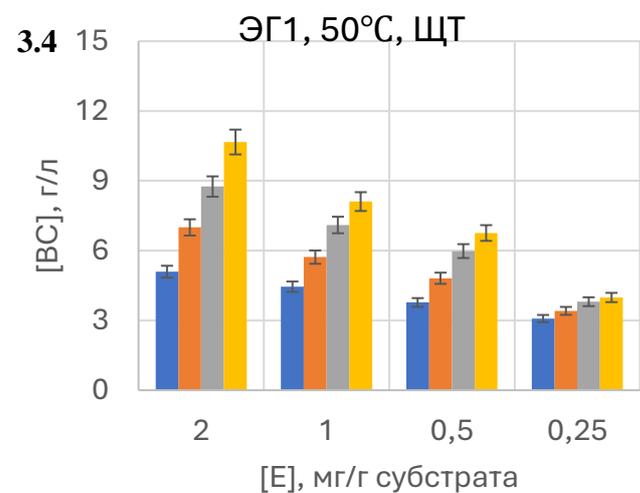
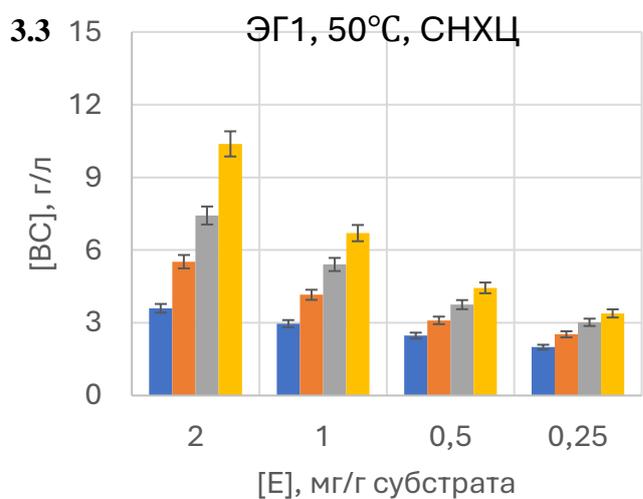
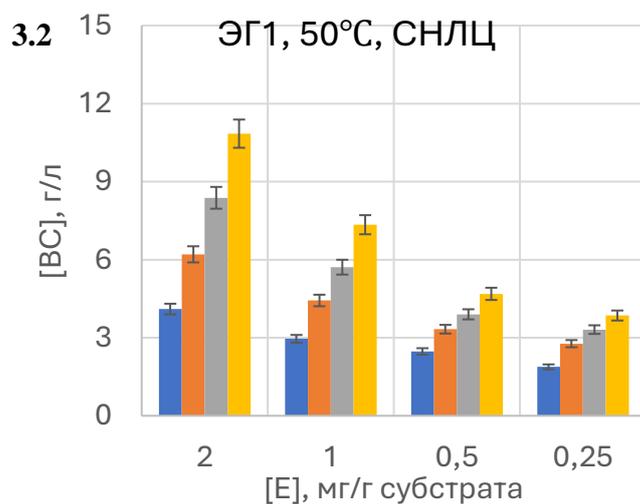
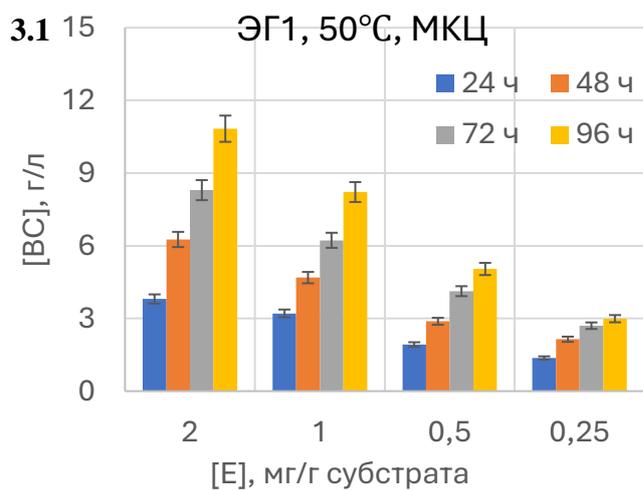


Рисунок 2.1–2.24. Изменение концентрации ВС в ходе гидролиза МКЦ, СНЛЦ, СНХЦ и ЩТ при различных дозировках ЭГ2н или ЭГ2д и различных температурах рН 5,0.



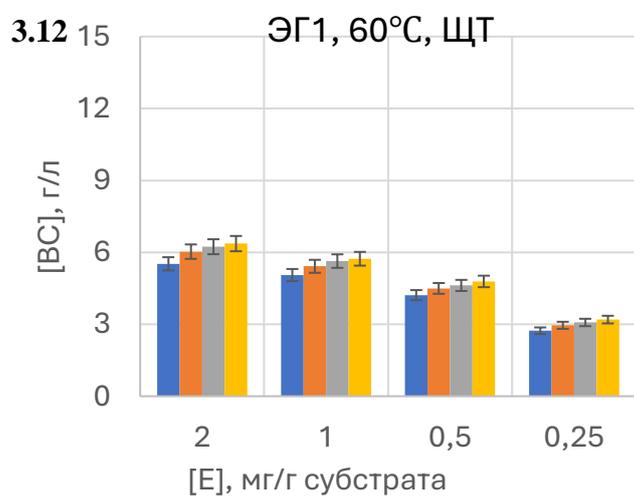
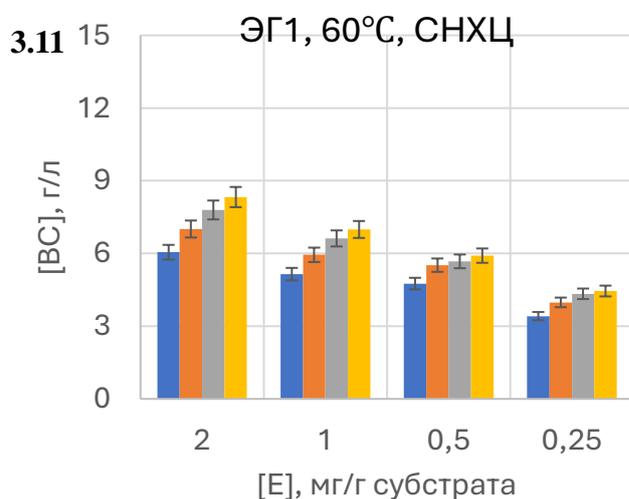
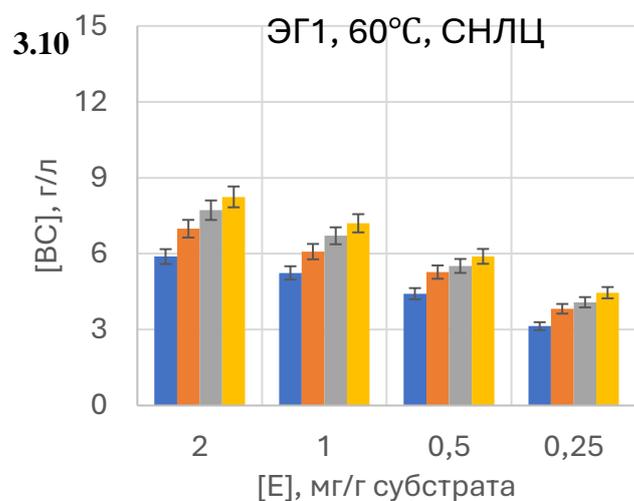
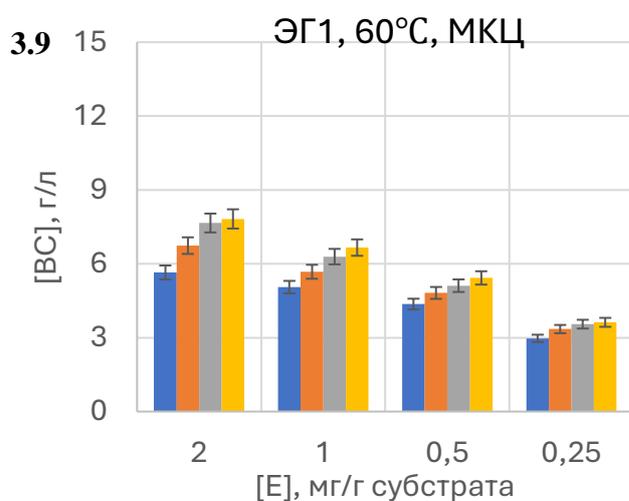
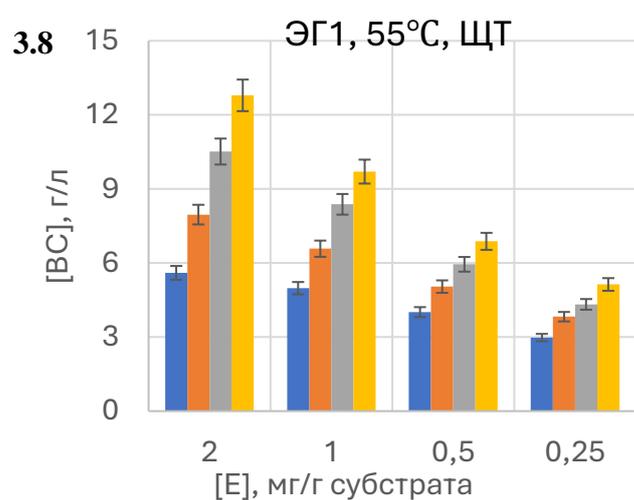
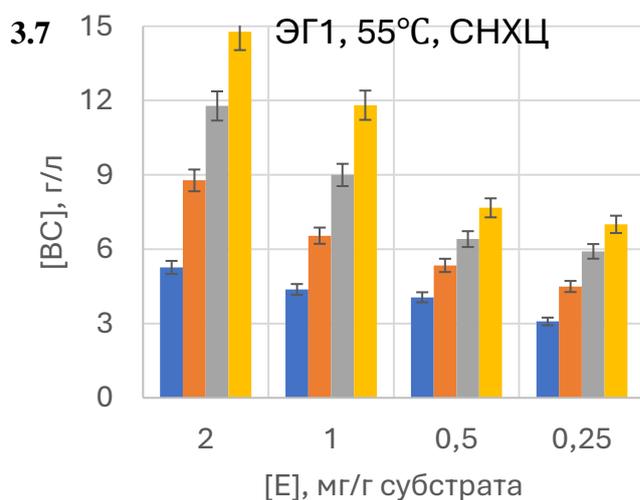


Рисунок 3.1–3.12. Изменение концентрации ВС в ходе гидролиза МКЦ, СНЛЦ, СНХЦ и ЩТ при различных дозировках ЭГ1 и различных температурах рН 5,0.

## Приложение 2. Гидролиз ЦСС смесями индивидуальных ферментов (к Главе 8)

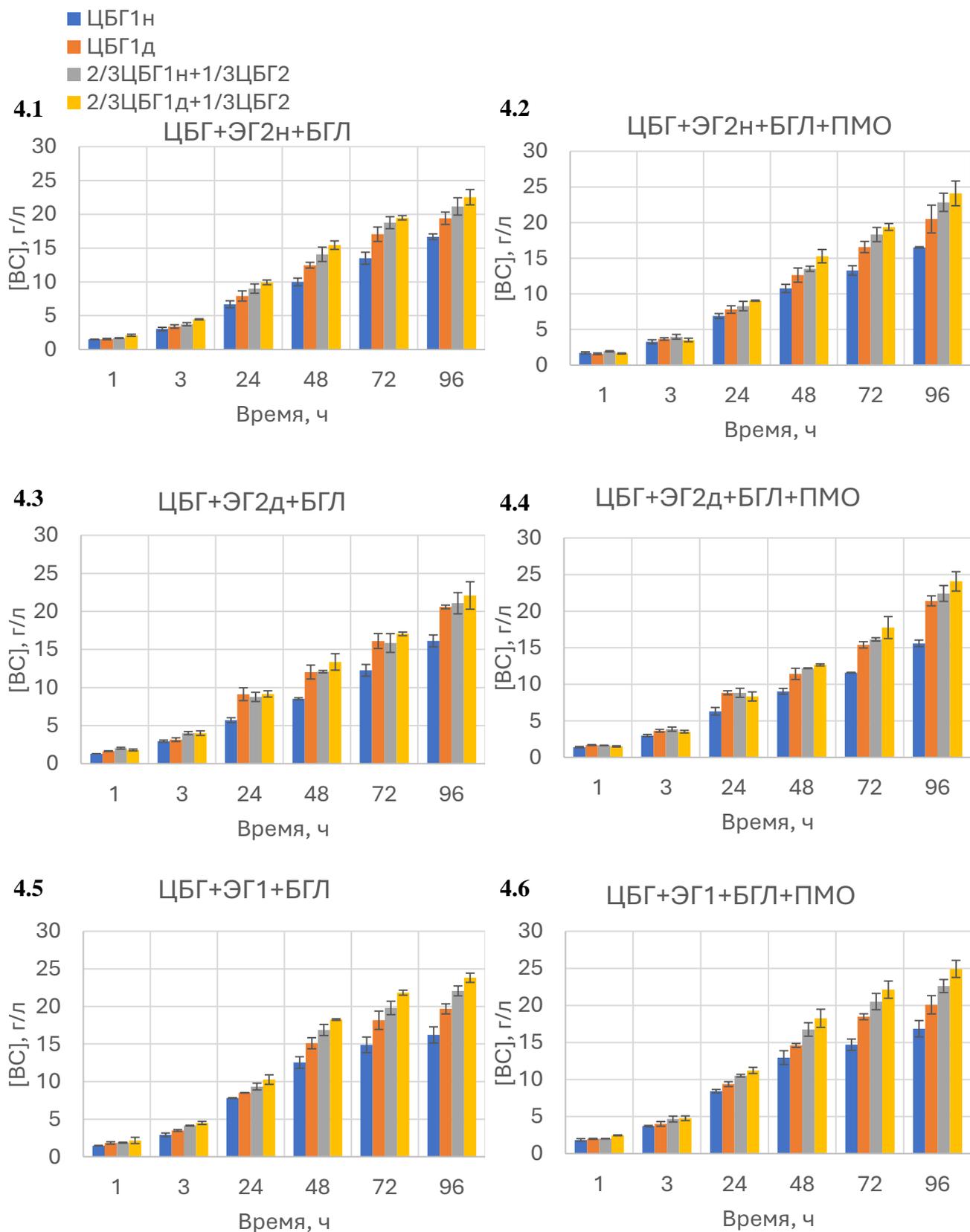


Рисунок 4.1–4.6. Изменение концентрации ВС в ходе гидролиза МКЦ (100 г/л) различными комбинациями индивидуальных ферментов (концентрация суммарного белка 1 мг/г субстрата) при pH 5,0, 55°C. В смесях варьировалась ЦБГ (каждый вариант отмечен своим цветом), ЭГ (ЭГ2н – рис. 4.1 и 4.2, ЭГ2д – рис. 4.3 и 4.4, ЭГ1 – рис. 4.5 и 4.6) и вспомогательный фермент (БГЛ – рис. 4.1, 4.3 и 4.5, БГЛ и ПМО – рис. 4.2, 4.4 и 4.6).

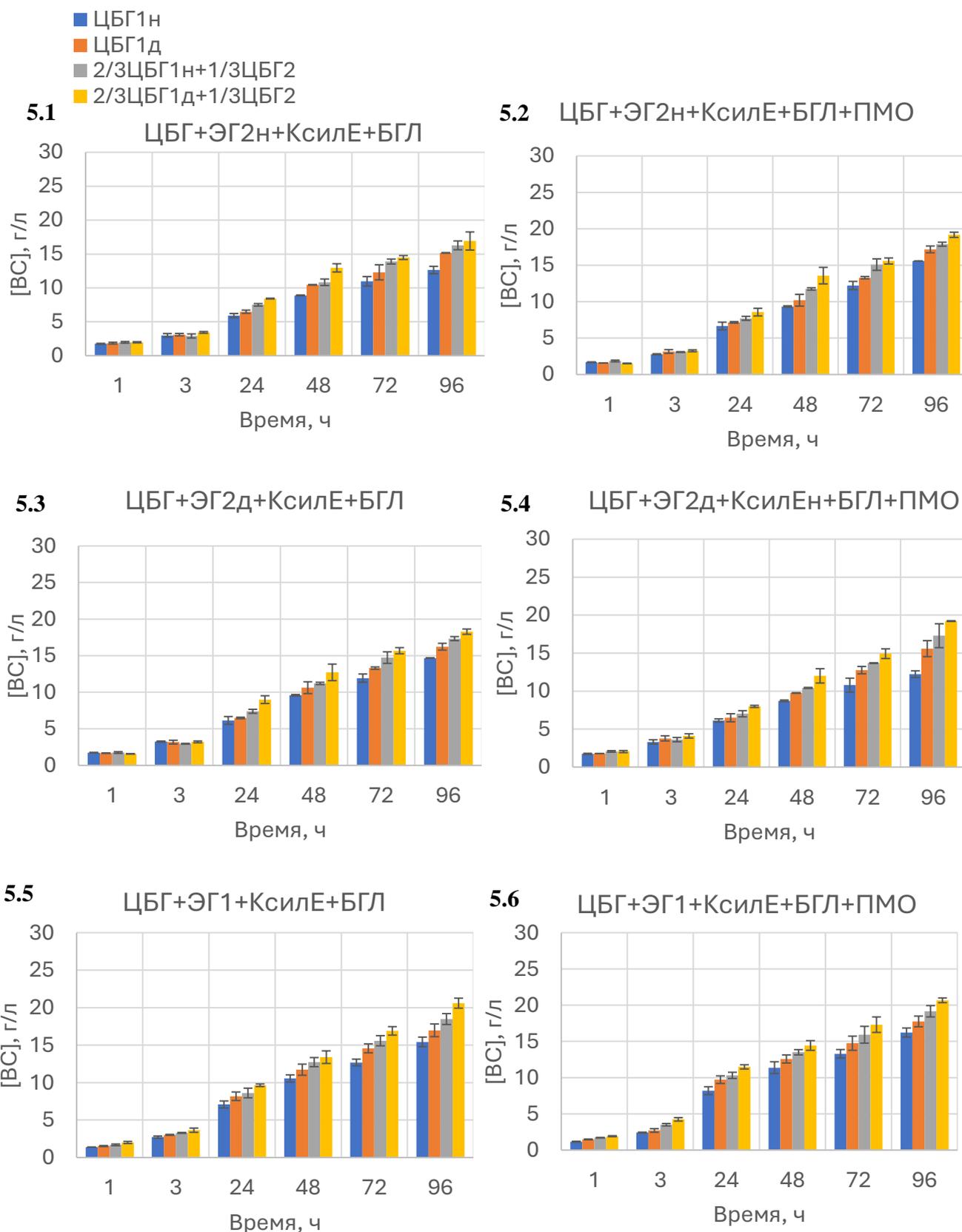


Рисунок 5.1–5.6. Изменение концентрации ВС в ходе гидролиза СНЛЦ (100 г/л) различными комбинациями индивидуальных ферментов (концентрация суммарного белка 1 мг/г субстрата) при pH 5,0, 55°C. В смесях варьировалась ЦБГ (каждый вариант отмечен своим цветом), ЭГ (ЭГ2н – рис. 5.1 и 5.2, ЭГ2д – рис. 5.3 и 5.4, ЭГ1 – рис. 5.5 и 5.6) и вспомогательный фермент (БГЛ – рис. 5.1, 5.3 и 5.5, БГЛ и ПМО – рис. 5.2, 5.4 и 5.6).

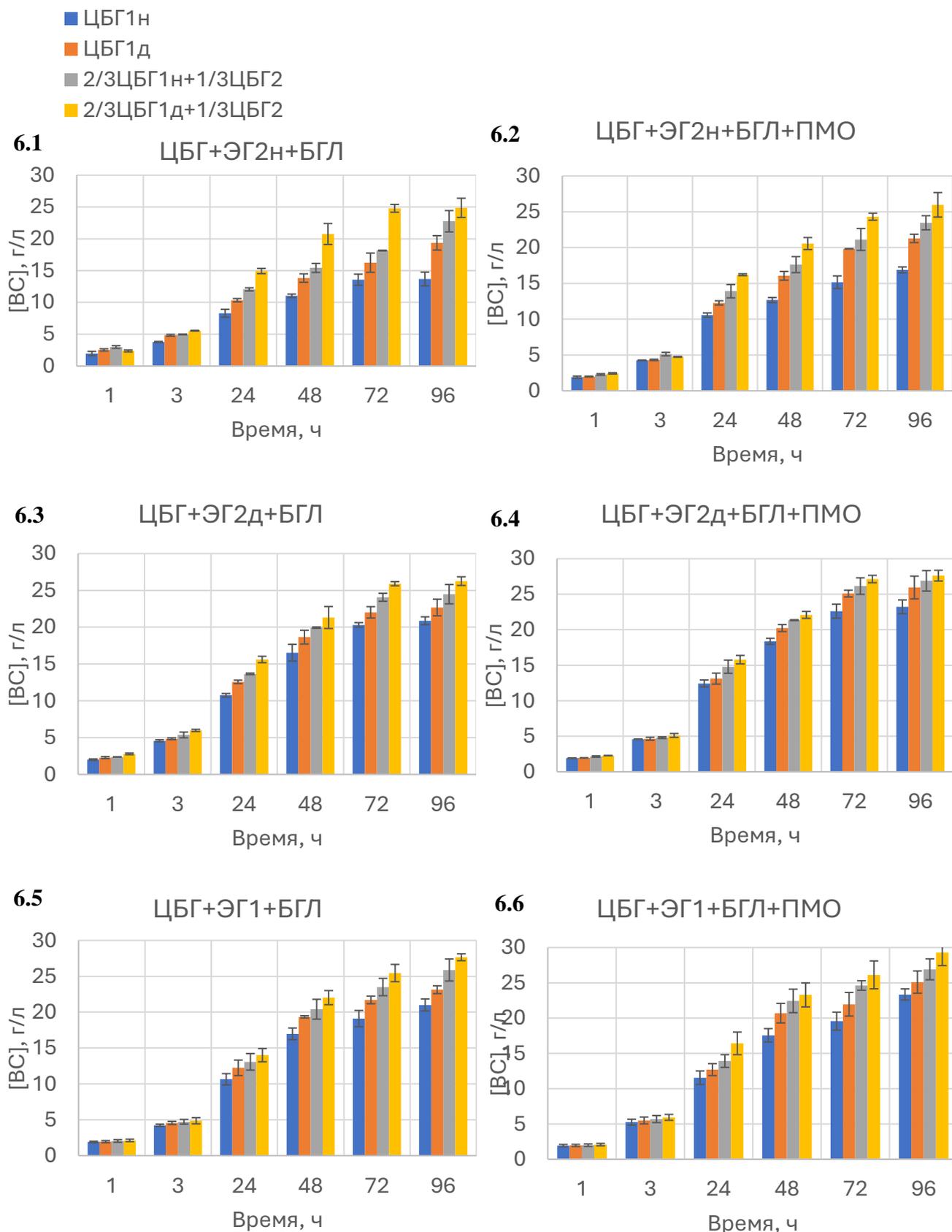


Рисунок 6.1–6.6. Изменение концентрации ВС в ходе гидролиза СНХЦ (100 г/л) различными комбинациями индивидуальных ферментов (концентрация суммарного белка 1 мг/г субстрата) при pH 5,0, 55°C. В смесях варьировалась ЦБГ (каждый вариант отмечен своим цветом), ЭГ (ЭГ2н – рис. 6.1 и 6.2, ЭГ2д – рис. 6.3 и 6.4, ЭГ1 – рис. 6.5 и 6.6) и вспомогательный фермент (БГЛ – рис. 6.1, 6.3 и 6.5, БГЛ и ПМО – рис. 6.2, 6.4 и 6.6).

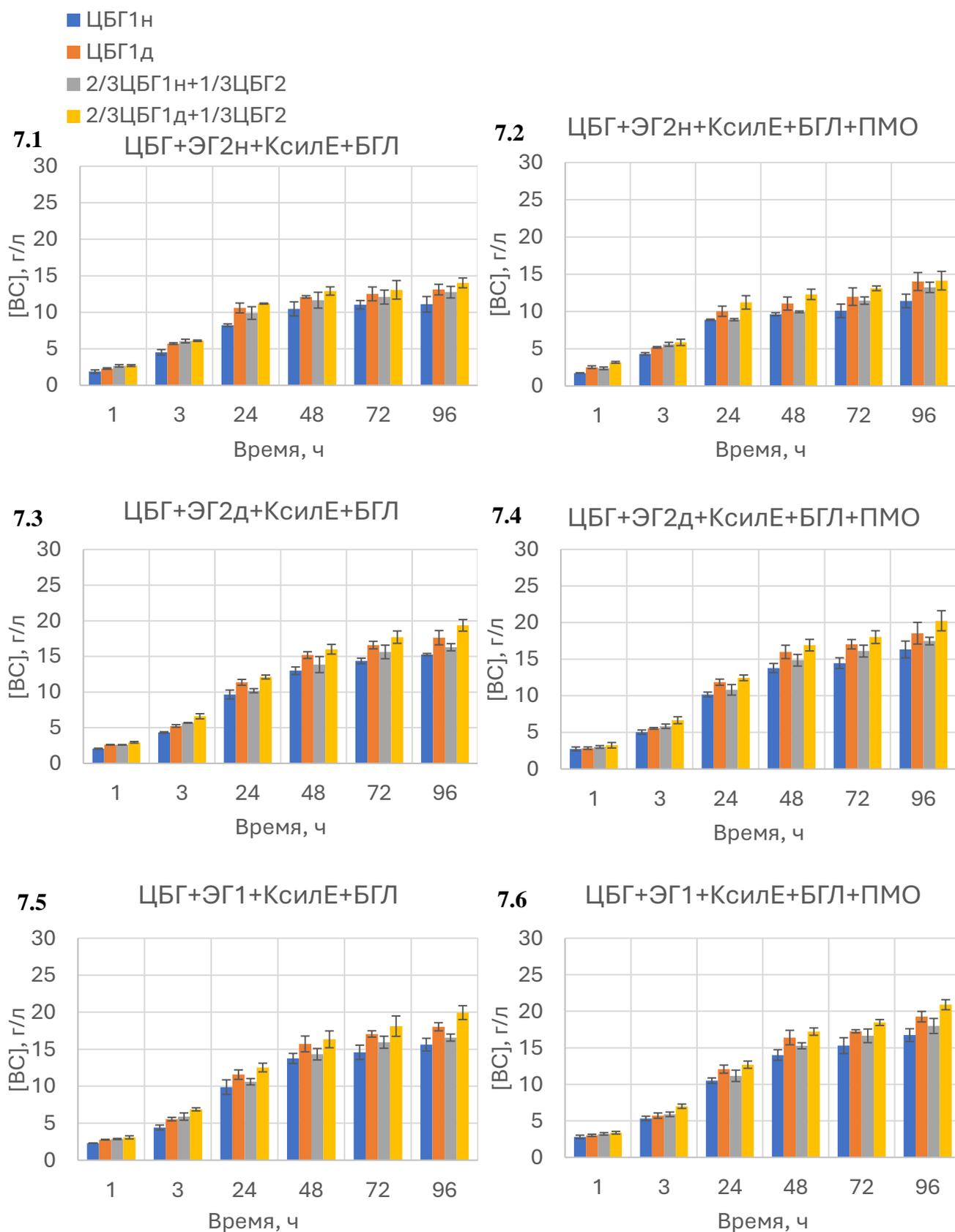


Рисунок 7.1–7.6. Изменение концентрации ВС в ходе гидролиза ЦТ (100 г/л) различными комбинациями индивидуальных ферментов (концентрация суммарного белка 1 мг/г субстрата) при рН 5,0, 55°C. В смесях варьировалась ЦБГ (каждый вариант отмечен своим цветом), ЭГ (ЭГ2н – рис. 7.1 и 7.2, ЭГ2д – рис. 7.3 и 7.4, ЭГ1 – рис. 7.5 и 7.6) и вспомогательный фермент (БГЛ – рис. 7.1, 7.3 и 7.5, БГЛ и ПМО – рис. 7.2, 7.4 и 7.6).

### Приложение 3. Получение и свойства новых препаратов (к Главе 9)

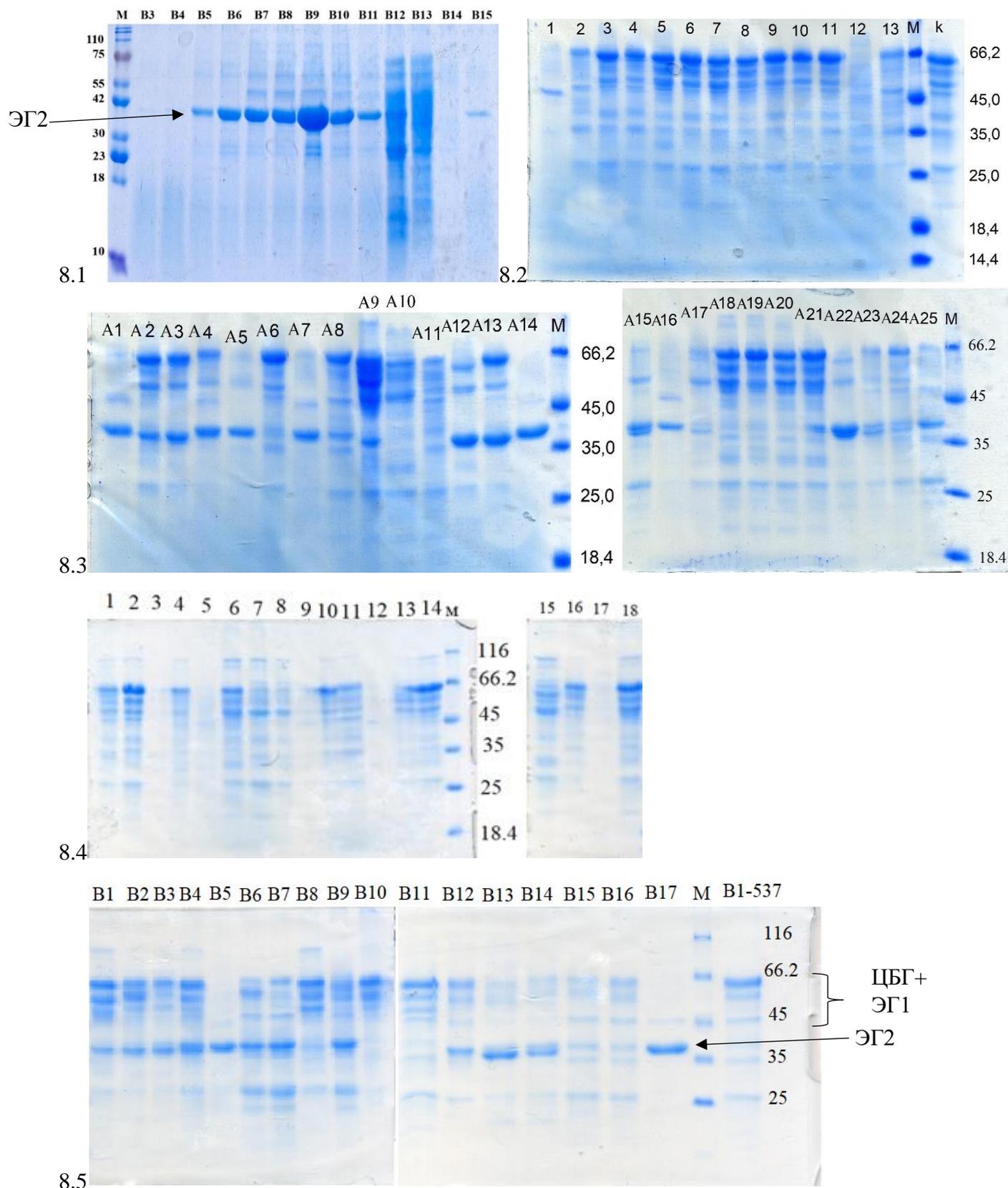
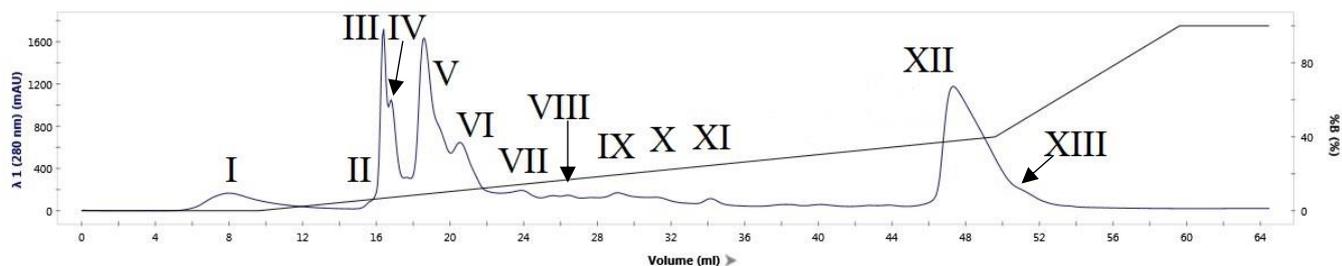


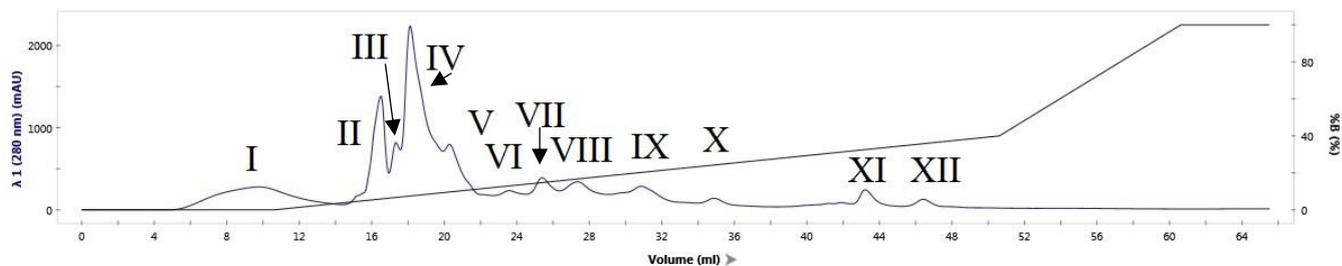
Рисунок 8.1–8.5. ПААГ-электрофореграммы белков КЖ трансформантов, несущих ген *egl2<sup>dg</sup>* (8.1), ген *cbh1<sup>dg</sup>* (8.2), гены *cbh1<sup>dg</sup>* и *egl2<sup>dg</sup>* (8.3), гены *cbh1<sup>dg</sup>* и *egl1* (8.4) и гены *egl2<sup>dg</sup>* и *egl1* (8.5).

Указаны массы стандартных белков в кДа.

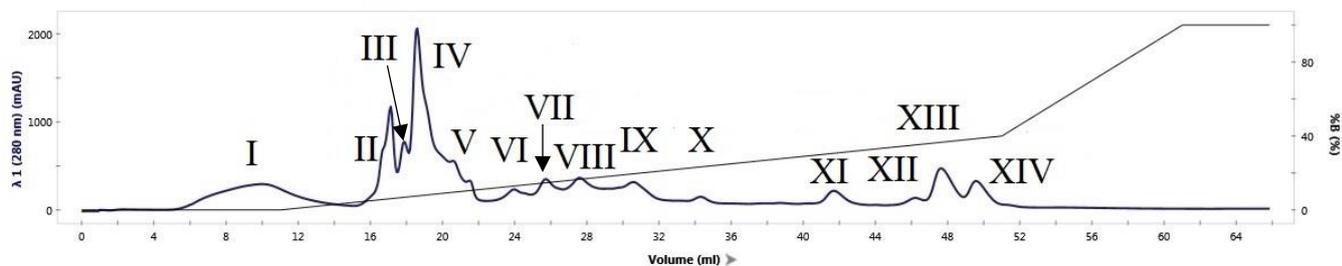
9.1.



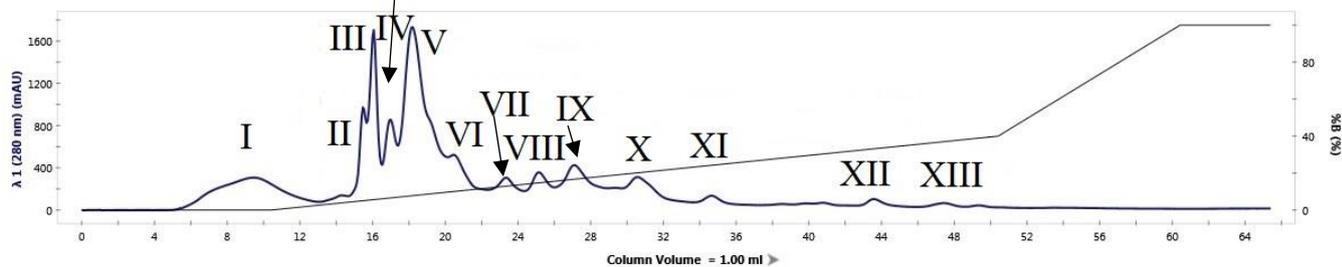
9.2.



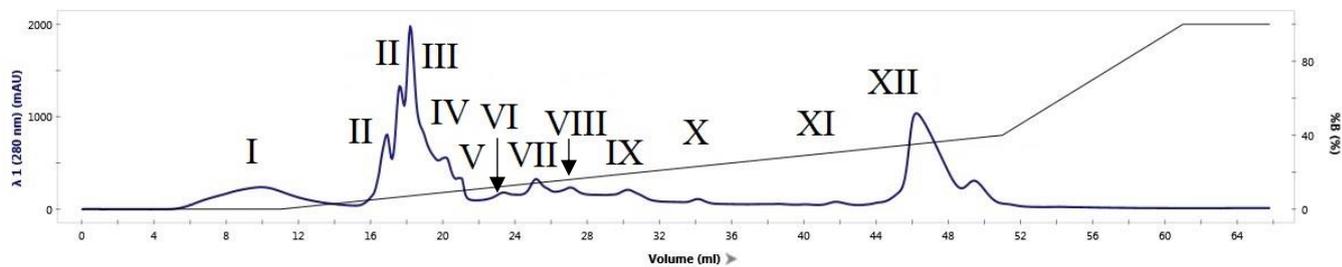
9.3.



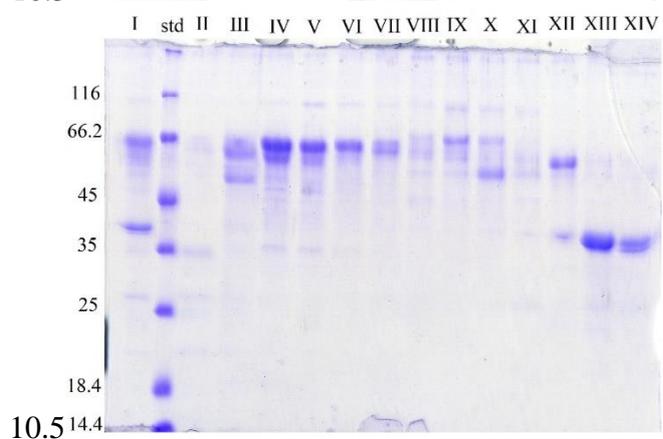
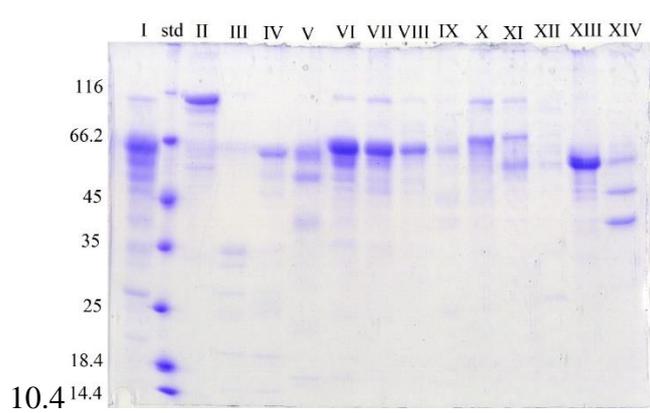
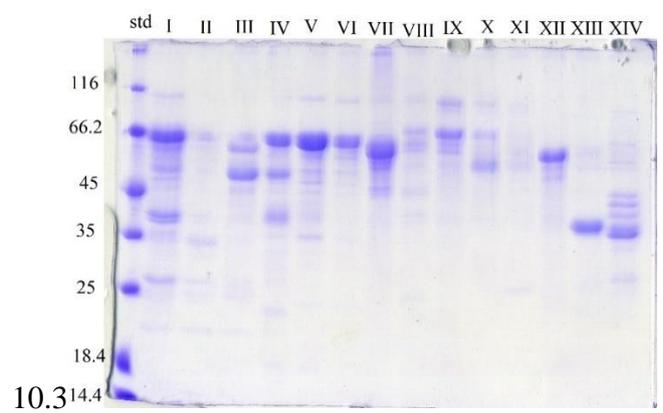
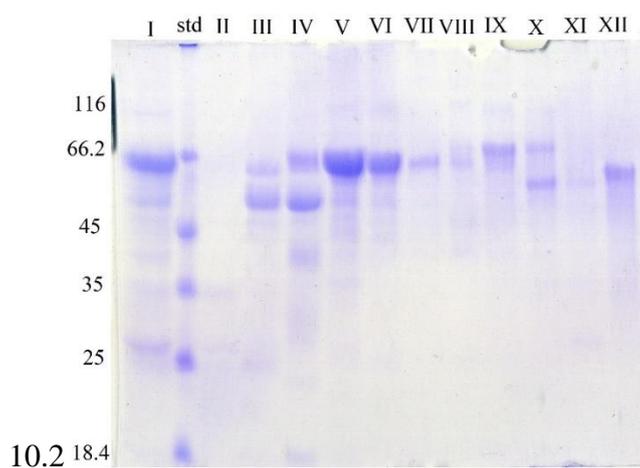
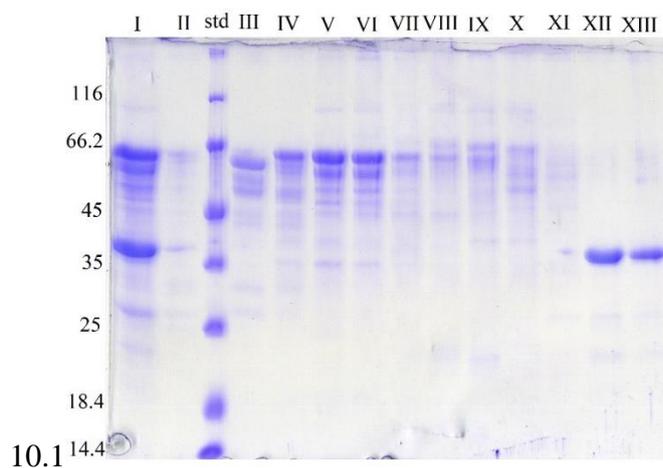
9.4.



9.5.



Рисунки 9.1-9.5. Результаты фракционирования препаратов PV-ЭГ2д (9.1), PV-ЦБГ1д (9.2), PV-ЦБГ1д-ЭГ2д (9.3), PV-ЭГ1-ЦБГ1д (9.4) и PV-ЭГ1-ЭГ2д (9.5) с помощью анионообменной хроматографии.

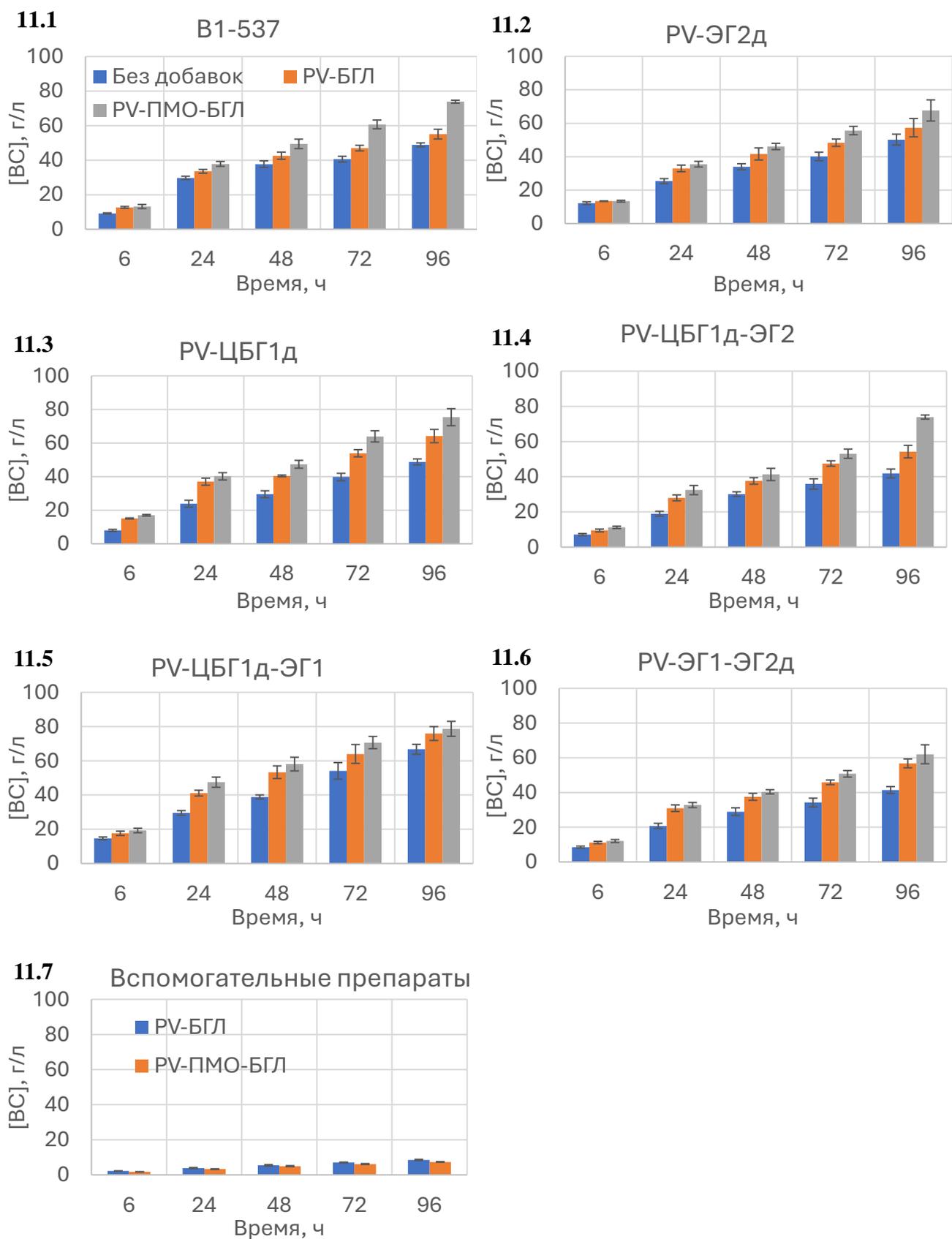


Рисунки 10.1-10.5. ПААГ-электрофореграммы фракций, полученных после анионообменной хроматографии препаратов РV-ЭГ2д (10.1), РV-ЦБГ1д (10.2), РV-ЦБГ1д-ЭГ2д (10.3), РV-ЭГ1-ЦБГ1д (10.4) и РV-ЭГ1-ЭГ2д (10.5). Указаны массы стандартных белков в кДа.

Таблица 1. Соотнесение фракций, полученных после анионообменной хроматографии препаратов, с целевыми белками.

Препарат Фермент	PV-ЭГ2д	PV-ЦБГ1д	PV-ЦБГ1д- ЭГ2д	PV-ЦБГ1д- ЭГ1	PV-ЭГ1- ЭГ2д
ЦБГ1н+ЦБГ1д	V-VI	IV-V	IV-V	V-VI	III-IV
ЦБГ2	II-III	II	II	II-III	II
ЭГ1	-	-	-	V-VI	III-V
ЭГ2н+ЭГ2д	XII	XII	XIII	XIII	XII
Ксиланаза	I	I	I	I	I

## Приложение 4. Гидролиз ЦСС новыми ФП (к Главе 11.1)



Рисунки 11.1–11.7. Изменение концентрации ВС в ходе гидролиза МКЦ (100 г/л) различными ферментными препаратами с и без добавления вспомогательных препаратов (суммарная концентрация белка 10 мг/г субстрата) при рН 5,0, 55°C.

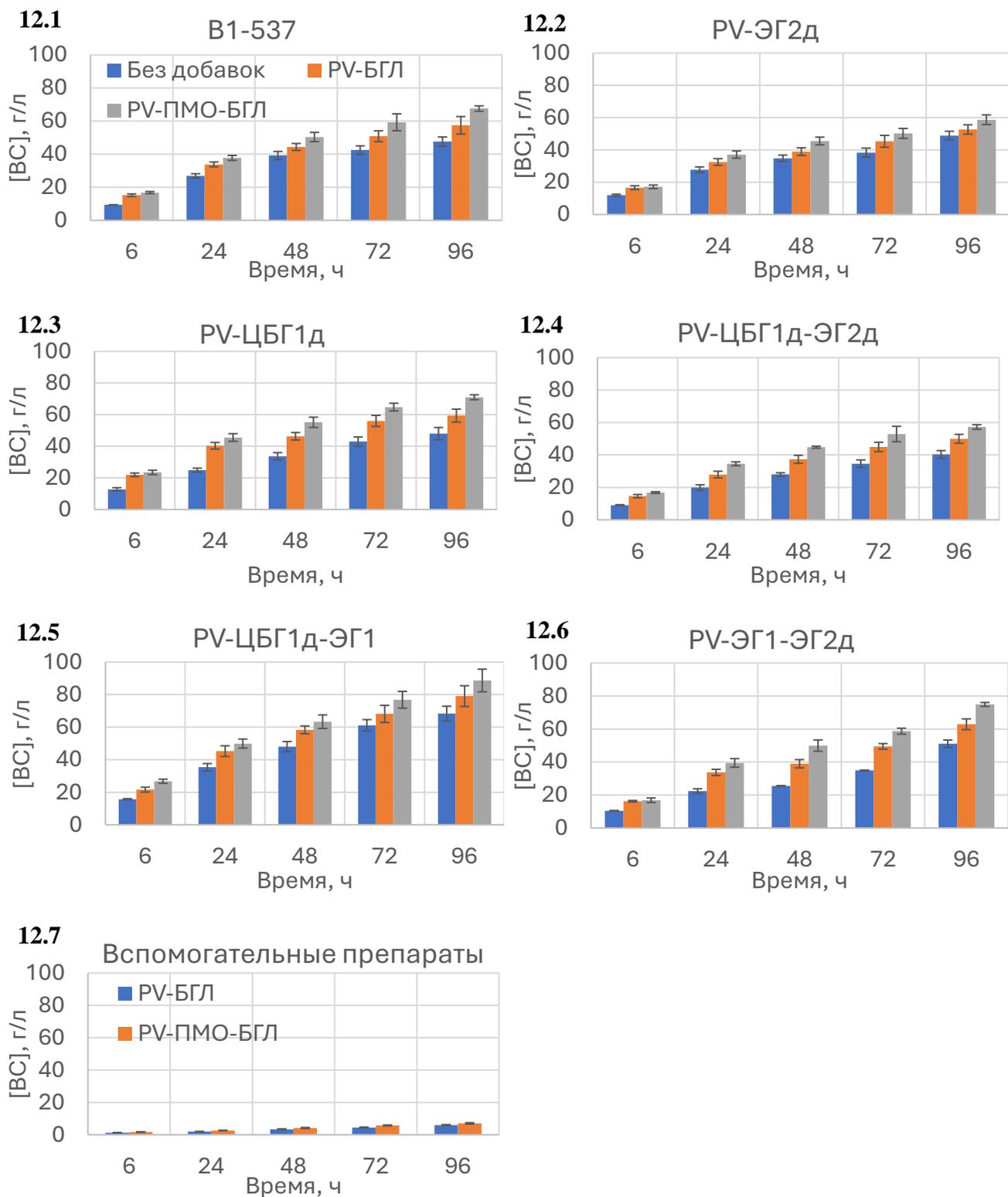


Рисунок 12.1–12.7. Изменение концентрации ВС в ходе гидролиза СНЛЦ (100 г/л) различными ферментными препаратами с и без добавления вспомогательных препаратов (суммарная концентрация белка 10 мг/г субстрата) при рН 5,0, 55°С.

Таблица 2. Состав низкомолекулярных сахаров после 24 и 96 ч гидролиза СНЛЦ (100 г/л) при pH 5,0, 55°C.

Препарат/смесь препаратов		Концентрация сахаров, г/л			
		ксилоза		глюкоза	
Время гидролиза, ч		24	96	24	96
В1-537	Без добавок	0,4±0,1	1,8±0,1	23±1	42±2
	PV-БГЛ	1,7±0,1	4,4±0,2	33±1	52±3
	PV-ПМО-БГЛ	1,2±0,1	1,9±0,1	34±2	59±3
PV-ЭГ2д	Без добавок	1,7±0,1	2,0±0,1	28±1	46±2
	PV-БГЛ	1,0±0,1	1,5±0,1	29±2	51±3
	PV-ПМО-БГЛ	1,4±0,1	1,7±0,1	33±2	56±3
PV-ЦБГ1д	Без добавок	2,6±0,1	3,6±0,1	19±1	37±2
	PV-БГЛ	3,1±0,2	4,2±0,2	37±2	55±3
	PV-ПМО-БГЛ	3,8±0,2	4,0±0,2	39±2	59±3
PV-ЦБГ1д-ЭГ2д	Без добавок	1,8±0,1	2,3±0,1	16±1	33±2
	PV-БГЛ	2,3±0,1	2,8±0,1	25±2	47±2
	PV-ПМО-БГЛ	4,0±0,2	4,0±0,2	39±2	53±2
PV-ЦБГ1д-ЭГ1	Без добавок	2,5±0,1	4,1±0,2	27±1	53±3
	PV-БГЛ	3,1±0,1	4,2±0,2	45±2	63±3
	PV-ПМО-БГЛ	3,2±0,1	5,3±0,2	47±3	65±3
PV-ЭГ1-ЭГ2д	Без добавок	3,3±0,1	3,7±0,1	16±1	37±2
	PV-БГЛ	2,2±0,1	4,5±0,2	31±2	51±2
	PV-ПМО-БГЛ	2,9±0,1	4,3±0,2	35±2	61±3
PV-БГЛ	-	0	0	1,4±0,1	2,4±0,1
PV-ПМО-БГЛ	-	0	0	1,3±0,1	3,0±0,1

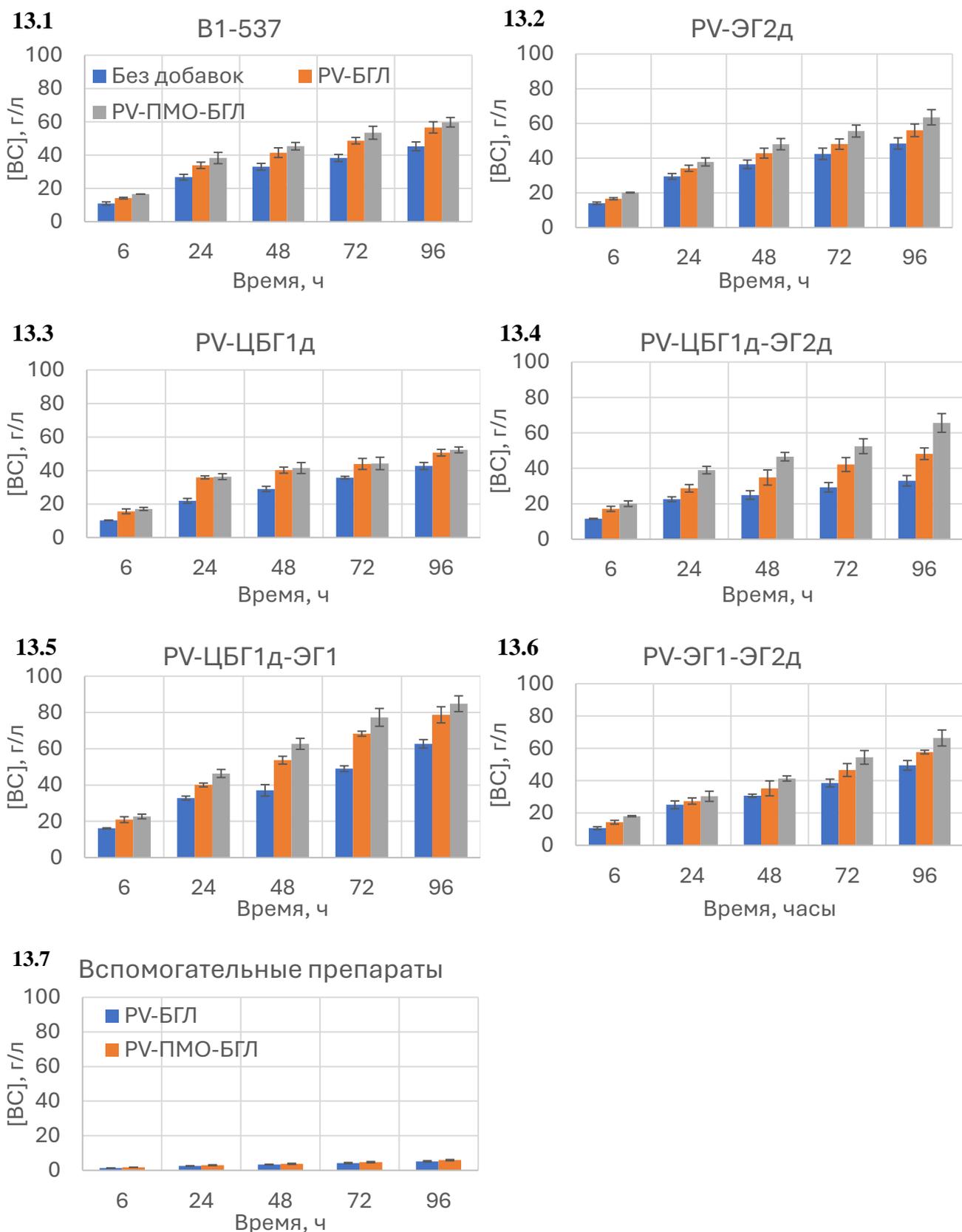


Рисунок 13.1–13.7. Изменение концентрации ВС в ходе гидролиза СХЦ (100 г/л) различными ферментными препаратами с и без добавления вспомогательных препаратов (суммарная концентрация белка 10 мг/г субстрата) при pH 5,0, 55°C.

Таблица 3. Состав низкомолекулярных сахаров после 24 и 96 ч гидролиза СНХЦ (100 г/л) при pH 5,0, 55°C.

Препарат/смесь препаратов		Концентрация сахаров, г/л			
		ксилоза		глюкоза	
Время гидролиза, ч		24	96	24	96
В1-537	Без добавок	0,6±0,1	1,0±0,1	26±1	41±2
	PV-БГЛ	0,8±0,1	1,5±0,1	35±2	53±2
	PV-ПМО-БГЛ	1,0±0,1	1,6±0,1	36±2	55±2
PV-ЭГ2д	Без добавок	0,6±0,1	1,2±0,1	27±1	46±2
	PV-БГЛ	0,7±0,1	1,5±0,1	36±2	49±2
	PV-ПМО-БГЛ	0,6±0,1	1,1±0,1	36±3	55±2
PV-ЦБГ1д	Без добавок	2,3±0,1	3,0±0,1	21±1	23±1
	PV-БГЛ	2,3±0,1	2,9±0,1	36±1	36±2
	PV-ПМО-БГЛ	1,7±0,1	2,1±0,1	36±2	42±2
PV-ЦБГ1д- ЭГ2д	Без добавок	1,5±0,1	1,5±0,1	21±1	30±1
	PV-БГЛ	1,2±0,1	1,3±0,1	28±2	34±2
	PV-ПМО-БГЛ	1,9±0,1	2,1±0,1	33±2	38±2
PV-ЦБГ1д- ЭГ1	Без добавок	2,1±0,1	3,0±0,1	31±2	45±2
	PV-БГЛ	2,8±0,1	3,7±0,1	40±2	47±2
	PV-ПМО-БГЛ	1,8±0,1	2,2±0,1	44±2	57±3
PV-ЭГ1-ЭГ2д	Без добавок	1,9±0,1	2,6±0,1	23±1	30±2
	PV-БГЛ	2,1±0,1	3,0±0,1	26±1	33±1
	PV-ПМО-БГЛ	0,9±0,1	1,0±0,1	27±1	45±2
PV-БГЛ	-	0	0	2,6±0,2	3,6±0,2
PV-ПМО-БГЛ	-	0	0	3,3±0,2	4,8±0,3

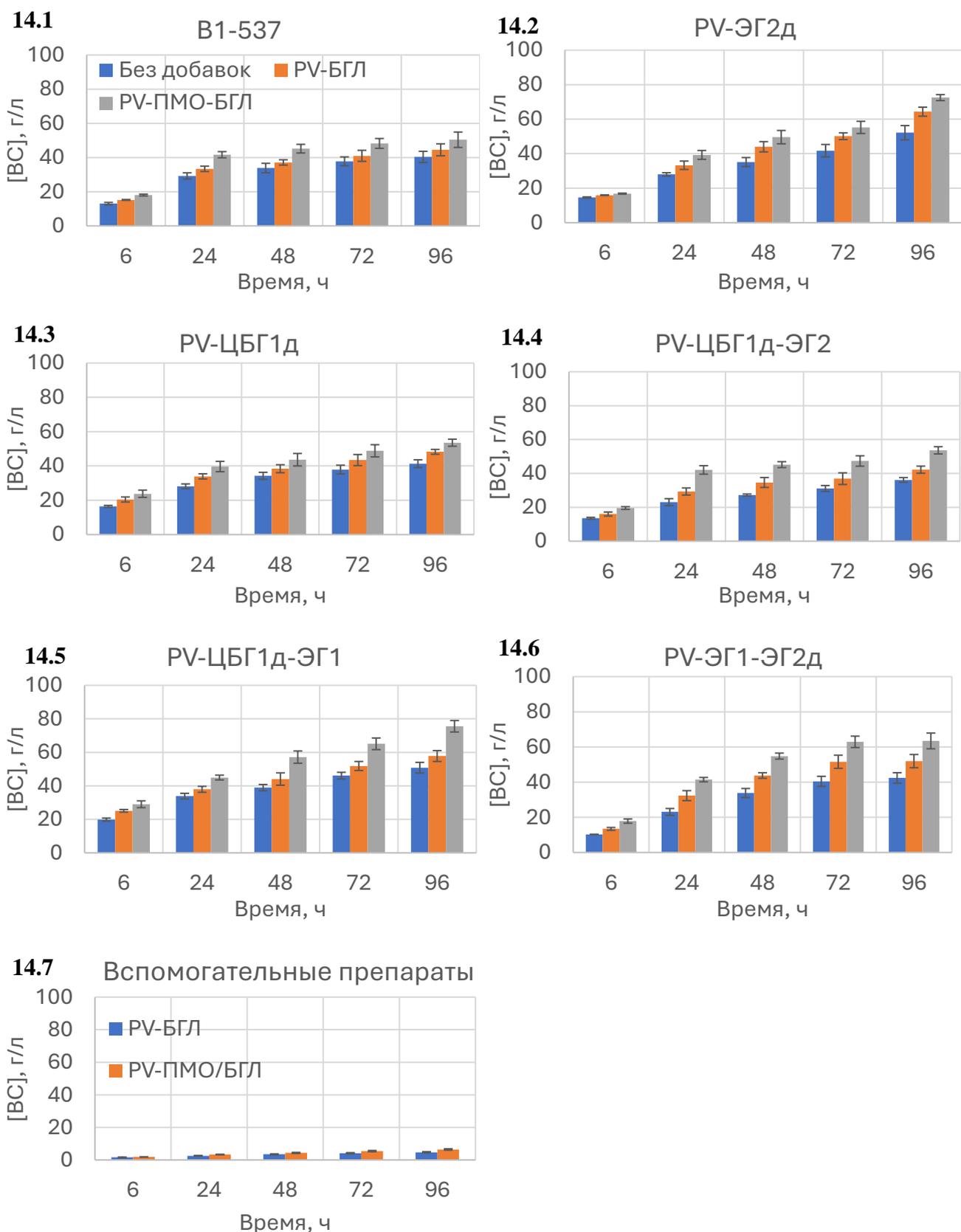


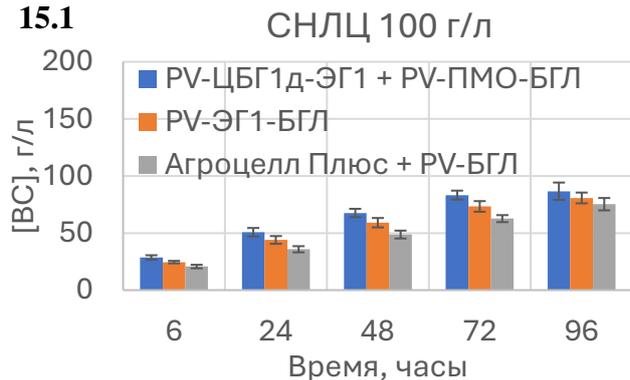
Рисунок 14.1–14.7. Изменение концентрации ВС в ходе гидролиза ЦТ (100 г/л) различными ферментными препаратами с и без добавления вспомогательных препаратов (суммарная концентрация белка 10 мг/г субстрата) при pH 5,0, 55°C.

Таблица 4. Состав низкомолекулярных сахаров после 24 и 96 ч гидролиза ЦТ (100 г/л) при рН 5,0, 55°C.

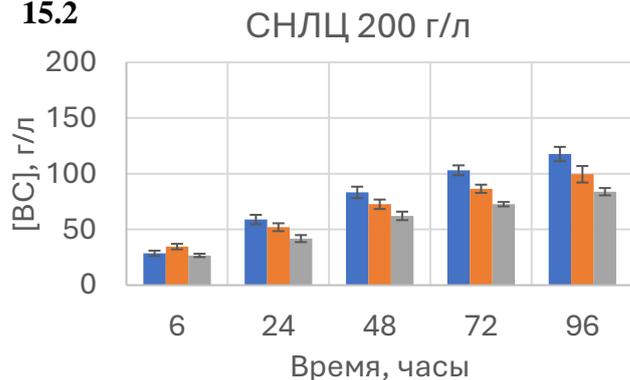
Препарат/смесь препаратов		Концентрация сахаров, г/л					
		ксилоза		арабиноза		глюкоза	
Время гидролиза, ч		24	96	24	96	24	96
В1-537	Без добавок	1,4±0,1	3,0±0,2	0,7±0,1	1,3±0,1	22±1	32±2
	PV-БГЛ	2,0±0,1	3,1±0,1	0,6±0,1	0,7±0,1	24±1	33±1
	PV-ПМО-БГЛ	2,8±0,1	4,2±0,2	1,6±0,1	1,2±0,1	36±2	39±2
PV-ЭГ2д	Без добавок	1,0±0,1	3,4±0,1	0,8±0,1	1,5±0,1	20±1	28±1
	PV-БГЛ	1,5±0,1	3,5±0,1	0,9±0,1	1,3±0,1	21±1	30±2
	PV-ПМО-БГЛ	2,2±0,1	4,6±0,2	0,7±0,1	1,4±0,1	35±1	40±2
PV-ЦБГ1д	Без добавок	4,3±0,2	6,8±0,3	0,7±0,1	1,4±0,1	19±1	26±1
	PV-БГЛ	4,4±0,2	5,7±0,2	1,0±0,1	0,9±0,1	24±1	30±1
	PV-ПМО-БГЛ	4,7±0,2	6,9±0,2	1,1±0,1	1,2±0,1	35±2	41±2
PV-ЦБГ1д-ЭГ2д	Без добавок	2,5±0,1	3,3±0,1	0,9±0,1	0,8±0,1	18±1	26±1
	PV-БГЛ	3,1±0,1	4,5±0,2	1,1±0,1	1,2±0,1	20±1	28±1
	PV-ПМО-БГЛ	4,2±0,2	7,5±0,4	0,9±0,1	1,7±0,1	35±2	40±2
PV-ЦБГ1д-ЭГ1	Без добавок	4,6±0,2	6,3±0,3	1,1±0,1	1,5±0,1	26±1	36±2
	PV-БГЛ	4,2±0,2	6,8±0,3	1,0±0,1	1,1±0,1	28±1	37±2
	PV-ПМО-БГЛ	5,9±0,3	8,5±0,4	2,1±0,1	1,5±0,1	47±2	52±3
PV-ЭГ1-ЭГ2д	Без добавок	3,7±0,2	5,6±0,3	0,8±0,1	1,9±0,1	16±1	28±1
	PV-БГЛ	4,4±0,2	6,8±0,3	1,8±0,1	1,3±0,1	23±1	33±1
	PV-ПМО-БГЛ	4,9±0,2	8,5±0,4	1,0±0,1	2,4±0,1	34±1	45±1
PV-БГЛ	-	0,5±0,1	1,1±0,1	0	0	1,3±0,1	2,8±0,1
PV-ПМО-БГЛ	-	0,7±0,1	1,3±0,1	0	0	2,1±0,1	4,7±0,3

**Приложение 5. Гидролиз сверхвысоких концентраций ЦСС (к Главе 11.2)**

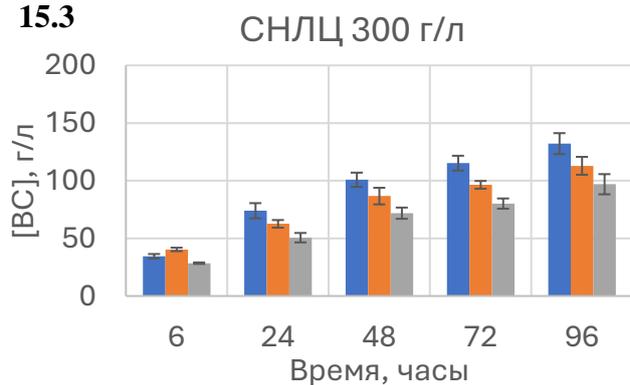
**15.1**



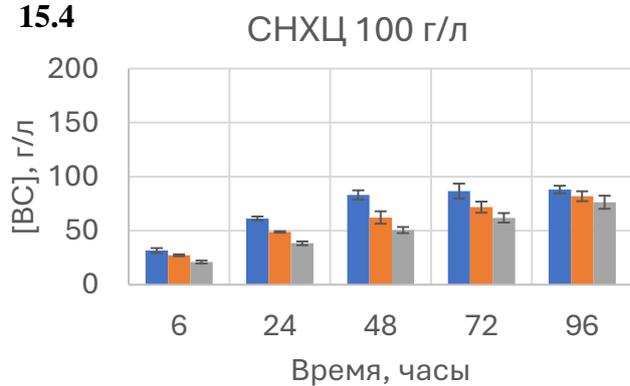
**15.2**



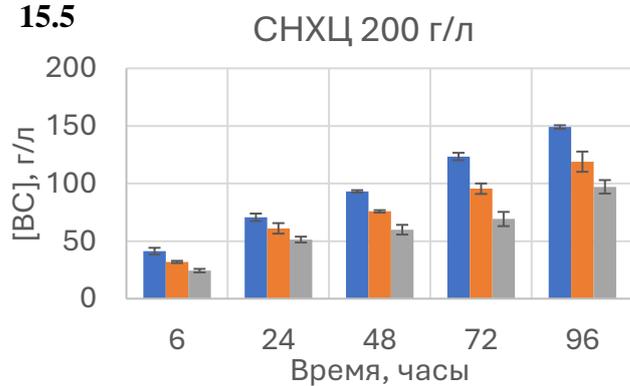
**15.3**



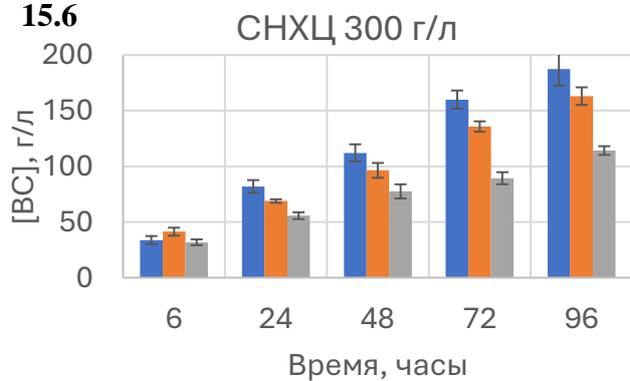
**15.4**



**15.5**



**15.6**



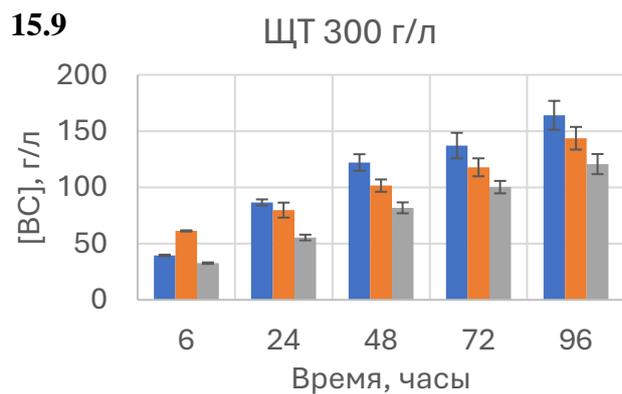
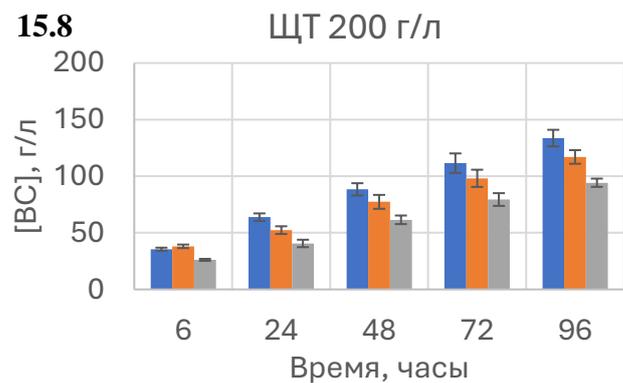
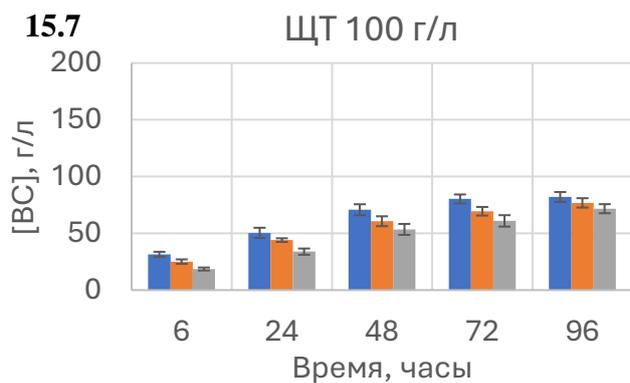


Рисунок 15.1–15.9. Изменение концентрации ВС в ходе гидролиза субстратов с повышенной концентрацией препаратом PV-ЭГ1-БГЛ (оранжевые столбцы) или смесями препаратов PV-ЦБГ1д-ЭГ1 + PV-ПМО-БГЛ (синие столбцы) или Агроцелл Плюс + PV-БГЛ (серые столбцы) при суммарной концентрации белка 10 мг/г субстрата, pH 5,0, 55°C.

Таблица 5. Состав низкомолекулярных сахаров после 24 и 96 ч гидролиза сырья.

Препарат/Смесь препаратов	Субстрат	[S], г/л	Концентрация сахаров, г/л					
			ксилоза		арабиноза		глюкоза	
Время гидролиза, ч			24	96	24	96	24	96
PV-ЦБГ1д-ЭГ1 + PV-ПМО-БГЛ	СНЛЦ	100	3,1±0,2	5,8±0,3	0	0	41±2	62±3
		200	4,3±0,2	6,7±0,3	0	0	46±2	64±3
		300	6,6±0,3	6,8±0,3	0	0	54±3	68±3
	СНХЦ	100	3,5±0,2	7,4±0,3	0	0	40±2	53±3
		200	4,2±0,2	5,2±0,2	0	0	51±2	60±3
		300	5,2±0,2	6,2±0,3	0	0	51±2	63±3
	ЩТ	100	8,6±0,4	13±1	1,3±0,1	1,8±0,1	45±2	47±2
		200	11±1	13±1	1,6±0,1	2,3±0,1	46±2	51±2
		300	15±1	19±1	1,7±0,1	3,3±0,1	50±2	54±2
PV-ЭГ1-БГЛ	СНЛЦ	100	2,6±0,1	4,5±0,2	0	0	39±2	63±3
		200	4,0±0,2	6,4±0,2	0	0	52±2	67±3
		300	5,2±0,2	6,9±0,3	0	0	54±3	70±4
	СНХЦ	100	3,3±0,1	5,4±0,2	0	0	51±2	57±3
		200	3,6±0,1	4,8±0,2	0	0	52±2	64±3
		300	4,8±0,2	6,3±0,2	0	0	53±2	69±3
	ЩТ	100	6,6±0,3	9,9±0,9	1,3±0,1	1,5±0,1	45±2	51±2
		200	12±1	15±1	2,1±0,1	2,5±0,1	50±2	51±2
		300	14±1	18±1	3,1±0,2	3,6±0,2	51±2	56±2
Агроцел Плюс + PV-БГЛ	СНЛЦ	100	2,8±0,1	5,5±0,2	0	0	40±2	57±3
		200	4,5±0,2	6,5±0,3	0	0	56±2	65±3
		300	5,7±0,3	6,8±0,3	0	0	56±2	66±3
	СНХЦ	100	3,1±0,1	4,4±0,2	0	0	45±2	55±2
		200	3,3±0,1	5,1±0,2	0	0	47±2	64±3
		300	5,5±0,2	7,1±0,3	0	0	51±2	67±3
	ЩТ	100	7,4±0,3	11±1	1,5±0,1	1,6±0,1	44±2	54±2
		200	11±1	16±1	1,7±0,1	1,8±0,1	44±2	54±2
		300	12±1	19±1	2,2±0,1	3,7±0,2	49±3	57±2

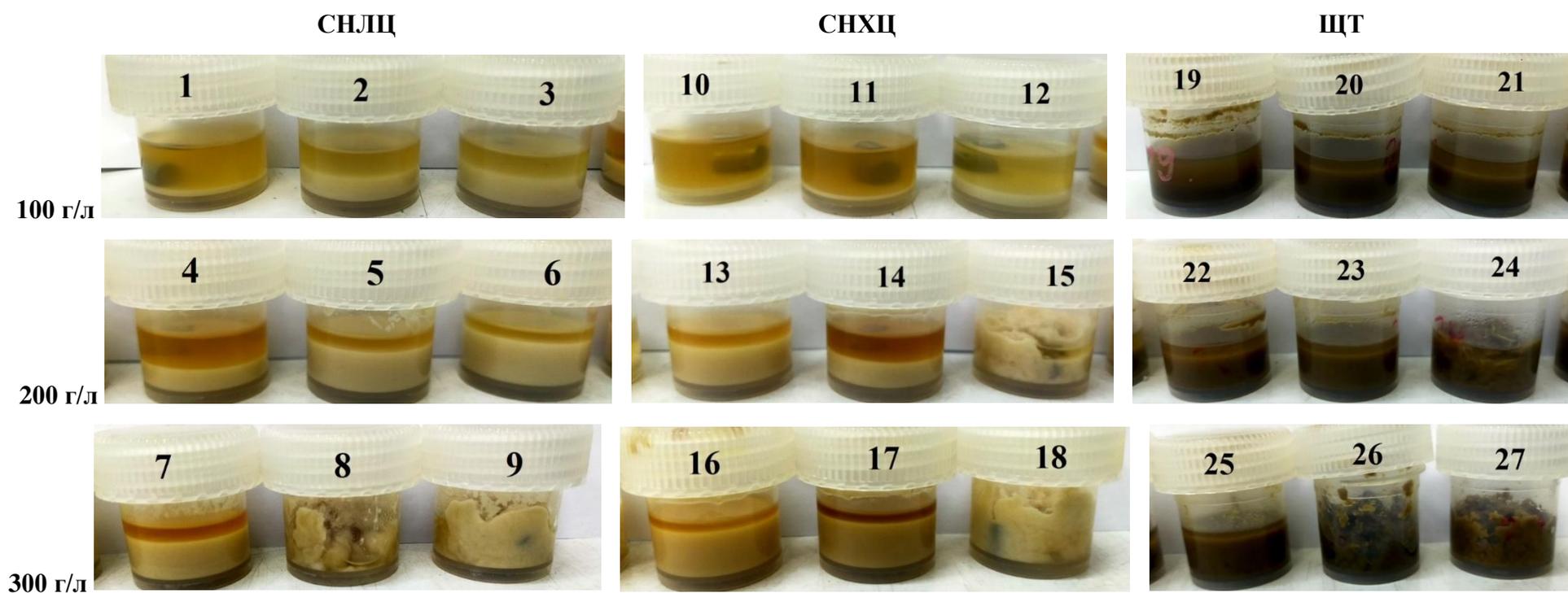


Рисунок 16. Внешний вид реакционных смесей после 96 ч гидролиза разного ЦСС (СНЛЦ, СНХЦ, ЩТ) с концентрацией 100, 200 или 300 г/л под действием смеси препаратов РV-ЦБГ1д-ЭГ1 + РV-ПМО-БГЛ (1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25), препарата РV-ЭГ1-БГЛ (2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26) или смеси препаратов Агроцелл Плюс + РV-БГЛ (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27), рН 5,0, 55°С.