

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова

На правах рукописи



Телицин Вадим Дмитриевич

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

1.5.6. Биотехнология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Москва - 2025

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научные руководители: **Семёнова Маргарита Викторовна**
кандидат химических наук

Синицына Ольга Аркадьевна
кандидат химических наук

Официальные оппоненты: **Нифантьев Николай Эдуардович**
доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБУН «Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН», заведующий лабораторией гликоконъюгатов

Швядас Витаутас-Юозапас Каятоно
доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», факультет биоинженерии и биоинформатики, профессор

Моисеенко Константин Валерьевич
кандидат биологических наук, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева», институт агробиотехнологии, кафедра биотехнологии, доцент

Защита диссертации состоится 17 июня в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.014.4 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 11Б, аудитория 202.

E-Mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3453>

Автореферат разослан ___ мая 2025 года

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Сакодынская И.К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 β-глюкозидаз (БГЛ). Глубина ферментативного гидролиза целлюлозы и состав продуктов её деструкции зависят от сбалансированности состава целлюлазного комплекса и уровня активности его индивидуальных компонентов.

Эффективность осаживающей 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, проведенные 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 осаживанию 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 осаживающей 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-β-глюкозиду (*n*-НФ-β-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)

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов, оборудования и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, состоящего из 223 ссылок и приложения. Диссертация изложена на 148 страницах и включает 30 рисунков, 21 таблицу и 5 приложений.

Сокращения, принятые в тексте: БГЛ – β -глюкозидаза *Aspergillus niger*, КсилЕ – ксиланаза Е *P.canescens*, ПМО – полисахаридмонооксигеназа *P.verruculosum*, ЦБГ – целлобиогидролаза, ЦБГ1д – дегликозилированная (мутантная) N194A форма целлобиогидролазы 1 *P.verruculosum*, ЦБГн – исходная (нативная) форма целлобиогидролазы 1 *P.verruculosum*, ЭГ – эндоглюканаза, ЭГ1 – эндоглюканаза 1 *T.reesei*, ЭГ2д – дегликозилированная (мутантная) N45A форма эндоглюканазы 2 *P.verruculosum*, ЭГ2н – исходная (нативная) форма эндоглюканазы 2 *P.verruculosum*; В1-537 – лабораторный препарат на основе штамма *P.verruculosum* Δ niaD; PV-ПМО, PV-БГЛ, PV-ПМО-БГЛ – лабораторные препараты на основе рекомбинантных штаммов *P.verruculosum* с высоким содержанием гомологичной ПМО, гетерологичной БГЛ или обоих ферментов соответственно; PV-ЦБГ1д, PV-ЭГ2д, PV-ЦБГ1д-ЭГ2д, PV-ЦБГ1д-ЭГ1, PV-ЭГ1-ЭГ2д – лабораторные препараты на основе рекомбинантных штаммов *P.verruculosum* с высоким содержанием мутантных ЦБГ1д, ЭГ2д и/или гетерологичной ЭГ1 (целевой фермент отражен в названии препарата); PV-ЭГ1-БГЛ – лабораторный препарат на основе рекомбинантного штамма *P.verruculosum* с высоким содержанием гетерологичных ЭГ1 и БГЛ; РСА-ЦБГ1д, РСА-ЭГ2д – лабораторные препараты на основе рекомбинантных штаммов *P.canescens* с высоким содержанием мутантных ЦБГ1д или ЭГ2д соответственно; ДМФ – диметоксифенол, КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза, МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза, *n*-НФ- β -Глк – *para*-нитрофенил- β -глюкозид, СНЛЦ – сульфатная небелёная листовенная целлюлоза, СНХЦ – сульфатная небелёная хвойная целлюлоза, ЩТ – предобработанный щёлочью тростник, ВС – восстанавливающие сахара, ДДС-ПААГ – полиакриламидный гель в присутствии додецилсульфата натрия, КЖ – культуральная жидкость, ФП – ферментный препарат, ЦСС – целлюлозосодержащее сырьё.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, показана научная новизна работы и её практическая значимость.

Обзор литературы

В обзоре литературы (главы 1-3) приведено описание ЦСС: его основные источники, состав клеточной стенки и состав различных видов ЦСС, а также методы предварительной

обработки ЦСС. Приведён список основных и вспомогательных целлюлаз гриба *P.verruculosum*, описано их строение, свойства и субстратная специфичность, а также их роль в процессе ферментативной деструкции целлюлозы. Рассмотрены методы увеличения эффективности биодegradации целлюлозы, более подробно – метод улучшения свойств ферментов с помощью рационального дизайна, основанного на аминокислотных заменах на примере ЦБГ1 и ЭГ2 *P.verruculosum*.

Экспериментальная часть

В экспериментальной части приводится список очищенных ферментов, ФП, субстратов, реактивов и хроматографических сорбентов, которые были использованы в ходе данной работы. Приведены методы определения каталитической активности к различным полимерным (КМЦ, МКЦ, ксилану, ксилоглюкану, арабиноксилану) и низкомолекулярным (*n*-НФ-β-Глк, 2,6-ДМФ) субстратам и метод определения концентрации белка. Описаны условия осахаривания ЦСС различного состава (МКЦ, СНЛЦ, СНХЦ, ШТ) и методики определения выхода ВС в процессе гидролиза, качественного и количественного состава низкомолекулярных сахаров в гидролизатах. Описаны методики анализа компонентного состава ФП и идентификации ферментов. Приведены условия и методы выделения и очистки ферментов из ФП.

Результаты и их обсуждение

Характеристика используемых ферментов

Для эффективного гидролиза ЦСС ферментный комплекс должен содержать основные (ЦБГ, ЭГ) и вспомогательные (БГЛ, ПМО) целлюлолитические ферменты, а также гемицеллюлазы (например, эндоксилазу Е, КсилЕ) в оптимальном соотношении, обеспечивающим наибольшую скорость превращения субстрата в продукты. В работе были использованы очищенные нативные и мутантные формы ЦБГ1 и ЭГ2 *P.verruculosum* как ключевые ферменты целлюлазного комплекса гриба. Нативные формы ЦБГ1н и ЭГ2н, а также ЦБГ2 были выделены из ФП В1-537, полученного на основе штамма *P.verruculosum* Δ*niaD* В1-537, дегликозилированные формы ЦБГ1д и ЭГ2д – из препаратов РСА-ЦБГ1д и РСА-ЭГ2д, полученных на основе рекомбинантных штаммов *P.canescens*, ПМО *P.verruculosum* – из ФП PV-ПМО с увеличенным содержанием ПМО, рекомбинантная БГЛ *A.niger* – из ФП PV-БГЛ, ЭГ1 *T.reesei* и КсилЕ *P.canescens* – из промышленных препаратов Агроцелл Плюс и Агроксил Премиум соответственно.

Схема очистки ферментов состояла из следующих этапов. ФП обессоливали с помощью гель-проникающей хроматографии на носителе Р4, затем подвергали хроматографическому разделению на колонке с анионообменником Source 15Q в градиенте NaCl. Во фракции, содержащие целевые ферменты, добавляли при перемешивании сульфат аммония до концентрации последнего 1,7 М, далее проводили разделение белков с использованием гидрофобной хроматографии на носителе Source Iso. На рисунке 1 приведена электрофореграмма очищенных ферментов. Видно, что чистота исследуемых белков составляет более 90%; дополнительные полосы, видимые в случае ЦБГ1н и ЦБГ2, соответствуют различным низкомолекулярным формам ферментов.

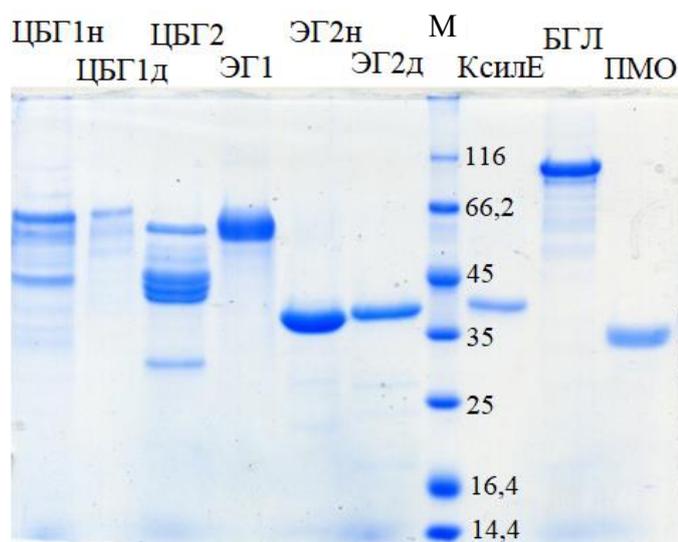


Рисунок 1. ДДС-ПААГ-электрофореграмма использованных индивидуальных ферментов.

Для всех использованных в работе ферментов были определены их активности по отношению к ряду субстратов в начальный период гидролиза при 50°C и pH 5,0 – в оптимальных условиях работы целлюлазного комплекса *P.verruculosum* в целом (табл. 1). Активностью по отношению к МКЦ обладали только ЦБГ и ЭГ1, наибольшую активность проявляла ЦБГ1д (0,89 ед/мг белка), активность ЦБГ1н была несколько меньше (0,65 ед/мг). Активность 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 к КМЦ также была высокой (37 ед/мг). Наибольшей активностью к ксилану обладала КсилЕ (77 ед/мг); значения неспецифической активности ЦБГ1н и ЦБГ1д к ксилану были близки и составляли 15 и 17 ед/мг соответственно; ЭГ1 также проявляла активность к ксилану (8 ед/мг). Для ЭГ1 была характерна высокая активность по отношению к ксилоглюкану (80 ед/мг). Наибольшей активностью к п-НФ-β-Глк обладала БГЛ (110 ед/мг белка). Активность к 2,6-ДМФ проявляла только ПМО (105 ед/мг).

Таблица 1. Активности индивидуальных 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 ⁻¹
ЦБГ1н	0,65±0,03	3,7±0,1	15±1	3,1±0,1	0	0	14±1	0,29±0,01
ЦБГ1д	0,89±0,07	3,2±0,6	17±1	0	0	0	10±1	0,34±0,01
ЦБГ2	0,16±0,01	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	33±2	0	0	0	0	19±2	275±9
ЭГ2д	0	40±3	0	0	0	0	22±2	166±9
КсилЕ	0	0	77±5	0	1,1±0,2	0	н.д.	н.д.
БГЛ	0	3,0±0,1	0	110±9	0	0	0,60±0,01	260±10
ПМО	0	0	0	0	0	105±4	6,4±0,4	8,2±0,2

Для определения кинетических параметров проводили эксперименты по варьированию концентрации специфического для каждого фермента субстрата в условиях, оптимальных для

работы целлюлазного комплекса *P.verruculosum* (рН 5,0, 50°C): МКЦ в случае ЦБГ, КМЦ в случае ЭГ, *n*-НФ-β-Глк в случае БГЛ, 2,6-ДМФ в случае ПМО. Значения K_m , каж. для ферментов, проявивших 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. k_{cat} , каж для ЦБГ и ПМО были достаточно низкими (0,12-0,34 с⁻¹), 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, величина k_{cat} , каж была на порядки выше – 166 и 275 для ЭГ2д и ЭГ2н соответственно и 260 с⁻¹ для БГЛ.

Кинетические параметры гидролиза специфических субстратов дегликозилированными и нативными формами ЦБГ1 и ЭГ2 различались: для ЦБГ1д наблюдалось снижение 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 у входа в активный центр приводит к увеличению степени процессивности действия фермента. В случае ЭГ2 проводилась замена N194A. Данная аминокислота находится на поверхности белковой глобулы, но на удалении от активного центра. Значения K_m , каж дегликозилированной и нативной форм ЭГ2 оказались близкими, тогда как k_{cat} , каж ЭГ2д значительно уменьшилась: 166 против 275 с⁻¹ 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 свойства (табл. 2). При определении рН-, температурного оптимумов и стабильности ферментов использовали их специфические субстраты (указаны выше). 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°C) и сравнивали исходную и остаточную концентрацию белка в надосадочной жидкости.

Таблица 2. Биохимические и физико-химические свойства очищенных ферментов.

Фермент	Масса, кДа	рН-оптимум	Т-оптимум, °С	Температурная 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

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°C. Температурный оптимум ЦБГ1н и ЦБГ1д составлял 55°C, ЭГ1 – 60°C, ЦБГ2 и БГЛ – 65°C, а для обеих форм ЭГ2 он оказался самым высоким – 70°C. Степень адсорбции в случае ЦБГ и ЭГ1 была порядка 80–90%, тогда как для остальных ферментов она была меньше 10%.

Сравнение гидролитической способности индивидуальных целлюлаз

Как показано выше, дегликозилированные формы ЦБГ1д и ЭГ2д обладают лучшими каталитическими свойствами по сравнению с их нативными формами при действии на специфический субстрат. Была проведена оценка гидролитической способности нативных и мутантных форм ЦБГ1 и ЭГ2, а также ЭГ1 по отношению к более сложным субстратам: был осуществлён гидролиз ЦСС различного происхождения и состава – МКЦ, СНЛЦ, СНХЦ и ЦТ. 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 сравнения свойств ферментов гидролиз проводили при нескольких температурах. В таблице 3 приведены значения концентрации ВС, полученные после 96 ч гидролиза ЦСС под воздействием индивидуальных ферментов при их дозировке в реакционной смеси 2 мг/г субстрата.

Таблица 3. Выход ВС (г/л) после 96 ч гидролиза разных видов ЦСС под воздействием очищенных индивидуальных ферментов при концентрации 2 мг/г, рН 5,0.

Температура, °С	Фермент	Субстрат			
		МКЦ	СНЛЦ	СНХЦ	ЦТ
50	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	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	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

ЦБГ1д обладала большей гидролитической способностью по сравнению с нативной формой 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 наблюдались при гидролизе МКЦ при 55 и 60°C. 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 ЦБГд на эти субстраты при 50 или 55°C составил 25-30 г/л. Наименьшая разница между действием ЦБГ1д и ЦБГ1н наблюдалась при гидролизе ЩТ. Следует отметить, что для обеих форм ЦБГ оптимальной температурой гидролиза любого из использованных субстратов была 55°C; при нагревании реакционной среды до 60°C значения выхода ВС после 96 ч гидролиза уменьшались до 2 раз.

При сравнении действия двух форм ЭГ2 на разные виды ЦСС преимущество дегликозилированной формы было незначительным. В целом выход сахаров при действии любой из форм был невысоким и составлял 1,4-4,7 г/л (из 100 г/л субстрата). Основной особенностью поведения как ЭГ2д, так и ЭГ2н была их высокая стабильность в исследуемом диапазоне температур, и оптимальная температура гидролиза для них составляла около 60°C.

В сравнении с обеими формами ЭГ2 индивидуальная ЭГ1 обладала значительно большей гидролитической способностью, однако уступала обеим формам ЦБГ1. 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). Для ЭГ1 был характерен ярко выраженный оптимум действия при 55°C – при нагревании реакционной среды до 60°C значения выхода ВС после 96 ч гидролиза уменьшались почти в 2 раза, как и в случае ЦБГ1.

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 соответственно. Оптимальной температурой гидролиза была 55°C.

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. verruculosum* способны оказывать синергетический эффект при совместном действии на субстрат. О положительном синергетическом эффекте можно говорить, если при воздействии смеси ферментов общий выход сахаров оказывается больше, чем суммарный теоретический выход от каждого из ферментов смеси. В качестве основных ферментов были использованы нативные формы ЦБГ1н и ЭГ2н, а также индивидуальные ЦБГ2 и ЭГ1, в качестве вспомогательных – ПМО, БГЛ.

Для изучения взаимодействия БГЛ и основных целлюлаз часть последних 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 рН 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. 2А). 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. 2Б).

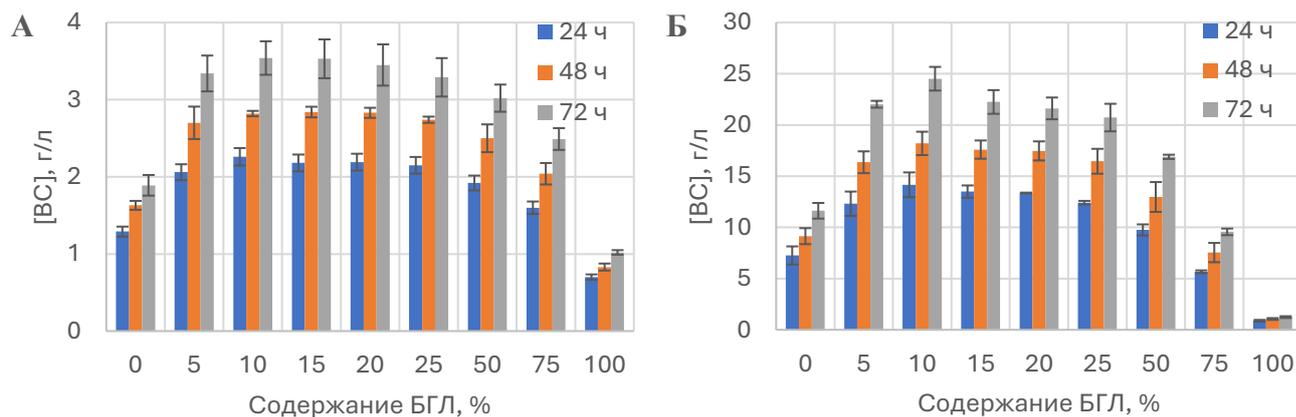


Рисунок 2. Выход ВС при гидролизе МКЦ смесями ЭГ2н/БГЛ (А) и ЦБГ1н/БГЛ (Б) при суммарной концентрации белка 1 мг/г субстрата, рН 5,0, 50°С.

Было установлено, что ПМО из гриба *P.veruculosum* обладает смешанным типом действия и способна окислять как С1-, так и С4-атом глюкозидного остатка. Однако было не до конца понятно её влияние на различные ферменты целлюлазного комплекса. Для изучения потенциального синергетического эффекта от присутствия ПМО проводили гидролиз МКЦ под действием смесей ЦБГ1н или ЦБГ2 с БГЛ в соотношении 9:1, в которой часть смеси замещали на эквивалентное количество ПМО, а также под действием смесей ЭГ1 или ЭГ2н с эквивалентным замещением на ПМО (в последнем случае в качестве субстрата использовали аморфную целлюлозу). 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 или аморфную целлюлозу (100 г/л). Гидролиз проводили при рН 5,0, 50°С.

На рисунке 3А показана зависимость концентрации ВС от состава указанных смесей на основе ЦБГ1н через 1 ч 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%. В случае смесей с ЦБГ2/БГЛ в аналогичных условиях наблюдалась схожая картина (рис. 3Б). При замещении части смеси ЦБГ2/БГЛ на ПМО через 1 час гидролиза наблюдалось увеличение выхода ВС. Наибольший выход наблюдался также при 15% ПМО и увеличение выхода ВС составило уже 88%.

Для ЭГ1 и ЭГ2н синергетическое взаимодействие с ПМО было менее выражено – увеличение выхода ВС составило 15 и 20% относительно теоретических значений (рис. 3В и 3Г соответственно).

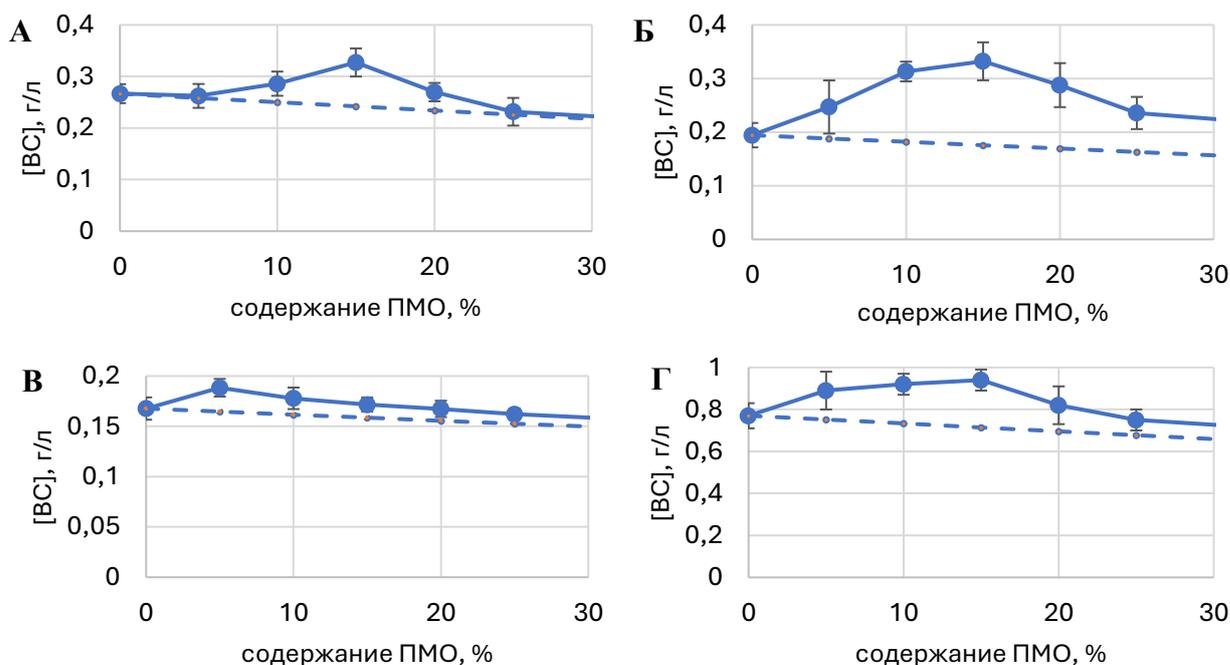


Рисунок 3. Выход ВС после 1 ч гидролиза МКЦ при pH 5,0, 50°C смесями ЦБГ1н/БГЛ (А), ЦБГ2/БГЛ (Б) и ЭГ1 (В) или аморфной целлюлозы смесями ЭГ2н с ПМО (Г). Пунктиром обозначен теоретический выход ВС для данной смеси ферментов.

Замена части ферментов на ПМО оказывало положительный эффект на выход сахаров и при длительном гидролизе. Смесями, содержащими 15% ПМО и 85% ЦБГ1н, ЦБГ2 (в обоих вариантах в присутствии БГЛ), ЭГ1 или ЭГ2н, был проведён гидролиз МКЦ или аморфной целлюлозы (в последнем случае) в течение 24 ч (рис. 4). После 1, 3, 6 и 24 ч определяли концентрацию ВС и рассчитывали значения коэффициента синергизма по формуле:

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

где $[BC]_{1+2}$ концентрация ВС, полученная под действием смеси ферментов, $[BC]_1$ и $[BC]_2$ – концентрации ВС, полученные за то же время реакции при 0 или 100% ПМО соответственно, W – массовая доля основной целлюлозы 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.

Наибольший синергетический эффект наблюдался для смесей с ЦБГ2 и ЭГ2н, и после 1 ч гидролиза значение коэффициента синергизма составляло 1,9 и 1,7 соответственно. Для смесей с ЦБГ1н этот эффект был слабее ($K_S = 1,4$ после 1 ч гидролиза). В случае ЭГ1 наблюдался наименьший синергетический эффект и $K_S = 1,2$ после 1 ч гидролиза. Однако с течением времени синергетический эффект 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.

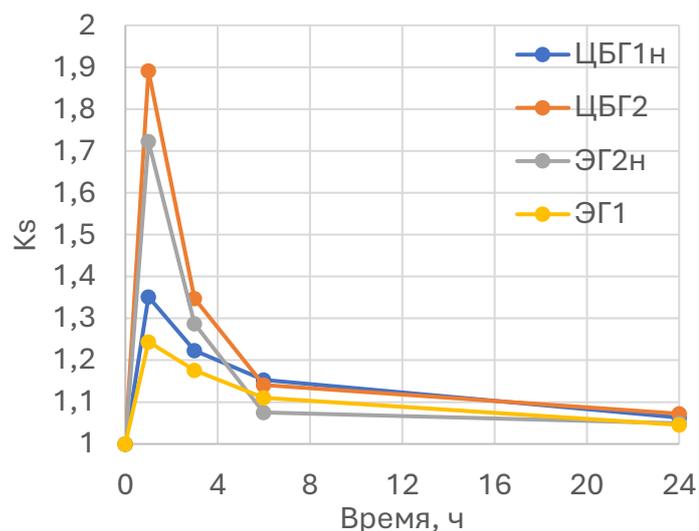


Рисунок 4. Изменение коэффициента синергизма (K_S) при действии смесей основных целлюлаз и ПМО на МКЦ (в случае ЦБГ1н, ЦБГ2 и ЭГ1) или аморфную целлюлозу (ЭГ2) при pH 5,0, 50°C.

Таким образом, наблюдалось положительное влияние БГЛ на гидролитическую активность ЦБГ1н и ЭГ2н. 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.

Гидролиз различных видов ЦСС смесями индивидуальных ферментов

Смесь ферментов, эффективная для осахаривания ЦСС, должна состоять из основных ферментов – эндо-деполимераз (ЭГ) и экзо-деполимераз (ЦБГ), а также вспомогательных, действующих на промежуточные продукты гидролиза (БГЛ) или способствующих увеличению доступности субстрата для основных целлюлаз (ПМО, эндоксилазы). Был проведен гидролиз ЦСС разными комбинациями ЦБГ (ЦБГ1н, ЦБГ1д, ЦБГ2), ЭГ (ЭГ2н, ЭГ2д, ЭГ1) и вспомогательных ферментов (индивидуальная БГЛ или БГЛ с ПМО). Ферменты смешивали в соотношении ЦБГ – 7, ЭГ – 2, БГЛ – 1. При гидролизе СНЛЦ и ШТ в реакционную смесь также вносили КсилЕ (она не участвует в гидролизе целлюлозы, но воздействует на ксилан, который содержится в данных субстратах в большом количестве): соотношение ЦБГ – 6,4, ЭГ – 1,3, КсилЕ – 1,3 и БГЛ – 1. Часть смесей вместо ЦБГ1 содержали смесь ЦБГ1 и ЦБГ2 в соотношении 2:1. Функцию ферментов эндо-деполимераз выполняли ЭГ2н, ЭГ2д или ЭГ1. В качестве вспомогательного фермента использовалась либо индивидуальная БГЛ, либо смесь БГЛ и ПМО в соотношении 1:1. Гидролиз вели в течение 96 ч при pH 5,0, 55°C и постоянном перемешивании. Концентрация субстрата составляла 100 г/л, а общая концентрация ферментов – 1 мг/г субстрата. Результаты представлены в таблице 4.

Было подтверждено преимущество дегликозилированной формы ЦБГд перед нативной при её использовании для гидролиза ЦСС: для любого субстрата значения выхода ВС после 96 ч гидролиза были на 5–10% выше в случае смесей, содержащих ЦБГ1д. Однако наибольший эффект при варьировании состава ЦБГ наблюдался в случаях добавления к ЦБГ1 (дегликозилированной или нативной) ЦБГ2, что объясняется отсутствием конкуренции между ЦБГ1 и ЦБГ2, действующих с разных концов молекулы целлюлозы. Преимущество смесей,

содержащих обе ЦБГ, составляло 15–25% относительно смесей только с ЦБГ1 (дегликозилированной или нативной).

Таблица 4. Выход ВС (г/л) после 96 ч гидролиза разных видов ЦСС под воздействием смесей индивидуальных ферментов при суммарной концентрации 1 мг/г субстрата, рН 5,0, 55°C.

Ферменты		Субстрат				
Основные		вспомогательные	МКЦ	СНЛЦ	СНХЦ	ЩТ
ЦБГ	ЭГ					
ЦБГ1н	ЭГ2н	БГЛ (+КсилЕ)	17±1	12±1	14±1	11±1
ЦБГ1д			19±1	15±1	19±1	13±1
ЦБГ1н+ЦБГ2			21±1	16±1	23±2	13±1
ЦБГ1д+ЦБГ2			23±1	17±1	25±2	14±1
ЦБГ1н		БГЛ+ПМО (+КсилЕ)	17±1	15±1	17±1	11±1
ЦБГ1д			21±2	17±1	21±1	14±1
ЦБГ1н+ЦБГ2			23±1	18±1	23±1	13±1
ЦБГ1д+ЦБГ2			24±2	19±1	26±2	14±1
ЦБГ1н	ЭГ2д	БГЛ (+КсилЕ)	18±1	15±1	21±1	15±1
ЦБГ1д			21±1	16±1	23±1	18±1
ЦБГ1н+ЦБГ2			21±1	17±1	25±1	16±1
ЦБГ1д+ЦБГ2			22±2	18±1	26±1	19±1
ЦБГ1н		БГЛ+ПМО (+КсилЕ)	17±1	14±1	23±1	16±1
ЦБГ1д			21±1	16±1	26±2	19±1
ЦБГ1н+ЦБГ2			22±1	17±2	27±1	18±1
ЦБГ1д+ЦБГ2			24±1	19±1	29±1	20±1
ЦБГ1н	ЭГ1	БГЛ (+КсилЕ)	16±1	15±1	21±1	16±1
ЦБГ1д			20±1	17±1	23±1	18±1
ЦБГ1н+ЦБГ2			22±1	19±1	26±2	17±1
ЦБГ1д+ЦБГ2			23±1	20±1	28±1	20±1
ЦБГ1н		БГЛ+ПМО (+КсилЕ)	17±1	16±1	24±1	17±1
ЦБГ1д			20±1	18±1	25±2	19±1
ЦБГ1н+ЦБГ2			23±1	19±1	27±2	18±1
ЦБГ1д+ЦБГ2			25±1	21±1	30±1	21±1

Варьирование источника эндо-деполимераз (ЭГ2н, ЭГ2д или ЭГ1) при гидролизе МКЦ, СНЛЦ и СНХЦ не привело к существенной разнице в результатах, выход ВС для смесей с разными ЭГ отличался в пределах погрешности. Но при гидролизе ЩТ было очевидным преимущество использования ЭГ2д или ЭГ1 перед ЭГ2н: выход ВС после 96 ч гидролиза смесями с любой комбинацией ЦБГ и вспомогательного фермента составлял 11-14, 15-20 и 16-21 г/л при использовании ЭГ2н, ЭГ2д или ЭГ1 соответственно.

При выборе комбинации вспомогательных ферментов небольшое преимущество имела смесь БГЛ и ПМО перед индивидуальной БГЛ.

В целом наибольший выход ВС при гидролизе МКЦ наблюдался при действии смесей ЦБГ1д+ЦБГ2+(любая)ЭГ+БГЛ+ПМО и составлял 24-25 г/л, при гидролизе СНЛЦ – ЦБГ1д+ЦБГ2+ЭГ1+БГЛ или БГЛ+ПМО (20-21 г/л), при гидролизе СНХЦ – ЦБГ1д+ЦБГ2+ЭГ2д

или ЭГ1+БГЛ+ПМО (29-30 г/л), при гидролизе ЩТ – ЦБГ1д+ЦБГ2+ЭГ2д или ЭГ1+БГЛ или БГЛ+ПМО (19-21 г/л). Т.е. необходимыми для эффективного осахаривания ЦСС являются ферменты ЦБГ1д, ЦБГ2, ЭГ2д, ЭГ1, БГЛ и ПМО.

Базовый комплекс препаратов целлюлаз на основе штаммов гриба *P.verruculosum* включает до 60% от общего пула ферментов ЦБГ (в соотношении ЦБГ1:ЦБГ2 2:1), около 10% ЭГ (в основном ЭГ2) и около 3% эндоксилаз. 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.

Получение, свойства и состав новых препаратов, содержащих дегликозилированные формы ЦБГ1д и ЭГ2д и гетерологичную ЭГ1 на базе штамма гриба *P.verruculosum* В1-537

Выше 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-реципиенте *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 собственных целлюлолитических ферментов. Сотрудники лаборатории биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН создали продуценты ЦБГ1д, ЭГ2д и ЭГ1, используя экспрессионную платформу *P.verruculosum* В1-537, характеризующуюся существенно более высокой продуктивностью, чем платформа *P.canescens*.

Для этого были созданы новые генетические конструкции (плазмиды), содержащие гены *cbh1^{dg}*, *egl2^{dg}* и *egl1*, кодирующие ЦБГ1д и ЭГ2д *P.verruculosum* и ЭГ1 *T.reesei* соответственно. Было получено несколько серий конструкций, которые содержали только ген *cbh1^{dg}*, только ген *egl2^{dg}*, одновременно гены *cbh1^{dg}* и *egl2^{dg}*, одновременно гены *cbh1^{dg}* и *egl1* и одновременно гены *egl2^{dg}* и *egl1*. Поскольку исходный штамм-реципиент *P.verruculosum* В1-537 имеет собственные ксиланазы и, как видно из таблицы 1, ЦБГ1 и ЭГ1 способны гидролизовать ксилан, перед нами не стояла задача получить препараты с увеличенным содержанием ксиланаз. Различные клоны рекомбинантных штаммов были культивированы в колбах на среде для *P.verruculosum* при 32°C в течение 144 ч. Далее культуральная жидкость (КЖ) была отделена от мицелия и проанализирована нами. Отбор полученных клонов проводился по уровню целевых активностей в соответствующей КЖ, наличию полосы целевого белка на электрофореграмме и результатам тестового гидролиза СНЛЦ на способность КЖ к разжижению субстрата. Было выбрано по одному клону из каждой серии и на их основе получены сухие ФП, представляющие собой лиофильно высушенную КЖ.

Для всех препаратов были измерены концентрация белка, специфические активности. Полученные результаты приведены в таблице 5.

Наибольшей активностью по отношению к МКЦ обладал препарат PV-ЦБГ1д-ЭГ1, причём удельная активность данного препарата (1,88 ед/мг белка) превосходила удельную активность контрольного препарата В1-537, полученного на основе штамма-реципиента (1,0 ед/мг). Это связано с тем, что и ЦБГ1д, и ЭГ1 обладали активностью к МКЦ.

Таблица 5. Удельные активности (ед/мг) исследуемых препаратов к ряду субстратов, рН 5,0, 50°C.

Препарат	КМЦ	Ксилан	МКЦ	<i>n</i> -НФ-β-Глк	Ксило- глюкан
PV-ЦБГ1д	14±2	25±3	0,46±0,07	0,50±0,09	7,7±0,9
PV-ЦБГ1д-ЭГ2д	14±2	29±4	0,41±0,07	0,77±0,09	6,3±0,9
PV-ЦБГ1д-ЭГ1	22±2	25±4	1,2±0,2	1,9±0,2	18±2
PV-ЭГ1-ЭГ2д	24±3	18±2	0,80±0,09	0,71±0,08	19±2
PV-ЭГ2д	23±2	14±1	0,37±0,04	0,06±0,01	6,0±0,5
B1-537	7±1	16±3	0,75±0,09	1,4±0,2	3,8±0,6

Активность к КМЦ увеличилась для всех полученных препаратов, наибольшими её значениями характеризовались ФП PV-ЭГ1-ЭГ2д и PV-ЭГ2д – их удельная активность увеличилась в 3,5 раза по сравнению с активностью контрольного препарата (с 7 до 24 ед/мг белка). Это можно объяснить высоким содержанием ЭГ2д (20–35 % от общего пула ферментов).

ЭГ1 обладала ксиланоглюканазной активностью, присутствие этого фермента в составе ФП привело к увеличению соответствующей активности. Так, для препаратов PV-ЦБГ1д-ЭГ1 и PV-ЭГ1-ЭГ2д (18–19 ед/мг) наблюдалось увеличение этой активности в 5 раз по сравнению с активностью контрольного препарата (3,8 ед/мг).

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

По данным ДДС-ПААГ-электрофореза (рис. 5) видно, что на электрофореграммах препаратов PV-ЦБГ1д-ЭГ2д, PV-ЭГ1-ЭГ2д и PV-ЭГ2д присутствовала мажорная полоса 40 кДа, соответствующая ЭГ2. По результатам тонкого фракционирования с помощью анионообменной хроматографии с последующим анализом активности и состава белковых фракций (табл. 6) её содержание составило 12, 20 и 35% для препаратов PV-ЦБГ1д-ЭГ2д, PV-ЭГ1-ЭГ2д и PV-ЭГ2д соответственно при содержании её в контрольном препарате на основе штамма-реципиента B1-537 около 3%.

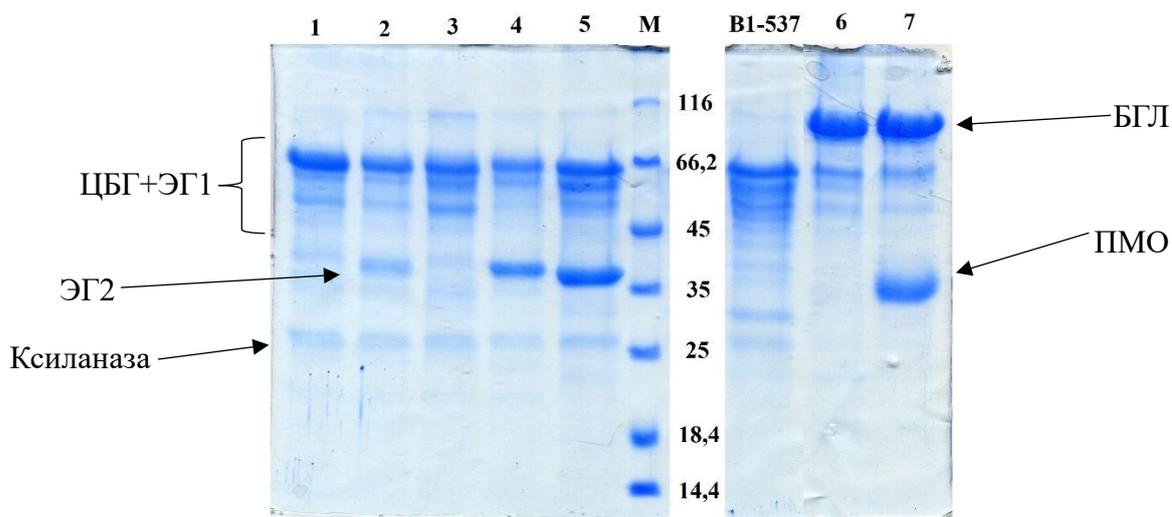


Рис. 5. ДДС-ПААГ-электрофореграмма исследуемых препаратов: 1 – PV-ЦБГ1д, 2 – PV-ЦБГ1д-ЭГ2д, 3 – PV-ЦБГ1д-ЭГ1, 4 – PV-ЭГ1-ЭГ2д, 5 – PV-ЭГ2д, 6 – PV-БГЛ, 7 – PV-ПМО-БГЛ и контрольного препарата B1-537.

По результатам тонкого хроматографического фракционирования содержание ЭГ1 в препаратах PV-ЦБГ1д-ЭГ1 и PV-ЭГ1-ЭГ2д составило 3,4 и 2,3% соответственно, тогда как в контрольном препарате этот фермент отсутствует.

Заметное увеличение содержания ЦБГ1 относительно контрольного ФП наблюдалось только для препарата PV-ЦБГ1д и составило 39%, в препаратах PV-ЦБГ1д-ЭГ2д и PV-ЦБГ1д-ЭГ1 оно составило 20%. Для всех полученных препаратов было характерно снижение содержания ЦБГ2 от 27% в контрольном ФП до 7-16%. Это можно объяснить тем, что в В1-537 целлюбиогидролазы занимают доминирующее положение, и увеличение доли каких-либо других ферментов приводит к неизбежному снижению их содержания.

Таблица 6. Состав исследуемых препаратов.

Препарат	Содержание фермента, %				
	ЦБГ1н+ЦБГ1д	ЦБГ2	ЭГ2н+ЭГ2д	ЭГ1	Ксиланазы
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
PV-ЭГ2д	16±1	13±1	35±3	0	2,3±0,2
Контроль В1-537	33±2	27±1	3,0±0,4	0	3,2±0,2

Свойства ФП, содержащих вспомогательные ферменты

На основе штамма-реципиента *P.verruculosum* В1-537 в лаборатории биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН был создан рекомбинантный штамм – продуцент гомологичной ПМО и гетерологичной БГЛ *A.niger*, позволивший получить ФП с высоким содержанием этих вспомогательных ферментов. Для сравнительного анализа свойств ФП PV-ПМО-БГЛ мы использовали препарат PV-БГЛ с увеличенным содержанием БГЛ *A.niger* (табл. 7). ДДС-ПААГ электрофореграмма указанных препаратов приведена на рисунке 5.

Таблица 7. Удельные активности ФП (ед/мг белка) по отношению к ряду субстратов при рН 5,0 (7,5 в случае 2,6-ДМФ), 50°C и содержание ПМО и БГЛ (%).

Препарат	2,6-ДМФ	n-НФ-β-Глк	МКЦ	КМЦ	Ксилан	ПМО	БГЛ*
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
PV-БГЛ	0	61,1±0,9	0,40±0,03	3,4±0,3	3,3±0,3	0	80
В1-537 контроль	0	1,80±0,08	0,86±0,07	13,0±0,9	20±1	<1	3

* собственная и рекомбинантная БГЛ

ФП PV-ПМО-БГЛ и PV-БГЛ обладали высокой β-глюкозидазной активностью (по отношению к n-НФ-Глк) – 31,8 и 61,1 ед/мг белка; β-глюкозидазная активность контрольного ФП В1-537 была низкой. Активность ПМО в ФП PV-ПМО-БГЛ по отношению к 2,6-ДМФ составила 0,041 ед/мг белка, а в В1-537 и PV-БГЛ таковая отсутствовала.

КМЦазная (эндоглюканазная) активность препаратов PV-ПМО-БГЛ, PV-БГЛ была приблизительно одинаковой (около 3,0 ед/мг белка), в случае ФП В1-537 активность к КМЦ была

выше и составляла 13 ед/г белка. Активность к МКЦ (целлюбиогидролазная 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.

Состав ФП определяли методом тонкого хроматографического фракционирования. Содержание ферментов в PV-ПМО-БГЛ составило 34% ПМО и 43% БГЛ от общего количества белка; препарат также содержал небольшое количество ЦБГ (15%) и ЭГ (5%).

Таким образом, ФП PV-ПМО-БГЛ представляется перспективным в качестве добавки к “базовому” целлюлазному комплексу.

Гидролитическая способность новых целлюлолитических ФП

Для оценки эффективности новых препаратов был проведен гидролиз разных видов ЦСС: МКЦ, СНЛЦ, СНХЦ и ЩТ. Гидролиз проводили при pH 5,0, 55°C в течение четырёх суток при постоянном 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 PV-ПМО-БГЛ. Для оценки вклада вспомогательных препаратов проводили гидролиз субстратов только этими ФП с концентрацией белка 1 г/л, что соответствует их концентрации в реакционной смеси при их добавлении к основным препаратам (концентрация образовавшихся сахаров была незначительна и в результатах ниже не приводится). Выход ВС после 96 ч гидролиза приведен в таблице 8.

Таблица 8. Выход ВС (г/л) после 96 ч гидролиза разных видов ЦСС под действием исследуемых ФП и их смесей при pH 5,0, 50°C. **Коричневым** цветом обозначены смеси, разжижение в которых произошло через 24 ч гидролиза, **оранжевым** – 48 ч, **светло-коричневым** – 72 ч, **светло-жёлтым** – 96 ч.

Препарат Субстрат		Препарат					
		В1-537	PV- ЦБГ1д	PV-ЦБГ1д- ЭГ2д	PV-ЦБГ1д- ЭГ1	PV-ЭГ2д- ЭГ1	PV- ЭГ2д
МКЦ	–	49±1	49±2	42±3	67±3	41±2	50±3
	PV-БГЛ	55±3	58±4	54±4	76±1	57±3	57±6
	PV-ПМО-БГЛ	74±1	76±1	74±1	78±1	60±2	68±6
СНЛЦ	–	48±3	48±4	40±2	68±5	60±1	42±1
	PV-БГЛ	57±5	59±4	50±3	79±6	63±3	49±2
	PV-ПМО-БГЛ	68±2	71±2	57±1	88±5	75±1	56±3
СНХЦ	–	40±1	43±2	33±3	63±2	49±3	48±3
	PV-БГЛ	52±2	50±2	48±3	79±4	58±1	56±4
	PV-ПМО-БГЛ	60±3	52±2	65±5	86±4	66±5	63±4
ЩТ	–	39±1	37±2	34±2	51±4	42±3	52±4
	PV-БГЛ	45±4	43±3	42±1	63±4	52±4	64±3
	PV-ПМО-БГЛ	50±4	50±3	51±4	79±4	63±4	73±2

Препарат PV-ЦБГ1д-ЭГ1 проявлял высокую гидролитическую способность даже без добавления препаратов вспомогательных ферментов, выход ВС после 96 ч гидролиза МКЦ, СНЛЦ или СНХЦ составлял 63-68 г/л, ЩТ – 51 г/л. При добавлении к нему препарата PV-БГЛ

как источника только БГЛ выход ВС при гидролизе любого ЦСС увеличивался на 13-25% относительно действия индивидуального ФП PV-ЦБГ1д-ЭГ1, а при добавлении препарата PV-ПМО-БГЛ – на 16-49% (наименьшие значения прироста выхода ВС соответствовали гидролизу МКЦ). К разжижению СНЛЦ после 24 ч приводило действие смесей PV-ЦБГ1д-ЭГ1 с PV-БГЛ или с PV-ПМО-БГЛ, а к разжижению СНХЦ за то же время только действие смеси PV-ЦБГ1д-ЭГ1 с PV-ПМО-БГЛ.

Использование PV-ПМО-БГЛ как препарата вспомогательных ферментов приводило к образованию большего количества сахаров при гидролизе ЦСС под действием любого препарата основных целлюлаз, чем при использовании PV-БГЛ. В случае действия смесей препаратов В1-537, PV-ЦБГ1д, PV-ЭГ2д-ЭГ1 и PV-ЭГ2д с PV-ПМО-БГЛ на СНЛЦ разжижение субстрата происходило раньше, чем при действии смесей этих же ФП с PV-БГЛ.

Действие лучших смесей препаратов на ЦСС приводило к образованию 78–79 г/л ВС при гидролизе МКЦ или ЩТ, 86–88 г/л при гидролизе СНЛЦ или СНХЦ, т.е. конверсия субстратов в сахара составила более 75 и 85% от массы соответственно.

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 увеличении концентрации субстрата в реакционной смеси выше определённого предела 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 при перемешивании при рН 5,0, 55°С в течение 4 суток. 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), и смесь коммерческого ФП Агроцелл Плюс 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 9 приведены концентрация ВС после 96 ч гидролиза и степень конверсии субстратов.

После 24 ч гидролиза полному разжижению подверглись все реакционные смеси, исходная концентрация субстрата в которых составляла 100 г/л. 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 за 72 ч произошло разжижение реакционной смеси с исходной концентрацией 200 г/л СНЛЦ или ЩТ, которые подверглись воздействию препарата PV-ЭГ1-БГЛ. Среди субстратов с исходной концентрацией 300 г/л полное разжижение произошло после 96 ч во всех случаях использования смеси PV-ЦБГ1д-ЭГ1 и PV-ПМО-БГЛ, и для СНХЦ, обработанного препаратом PV-ЭГ1-БГЛ.

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 комбинации 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 (предпочтительный субстрат для данной смеси ферментов) – 86, 149 и 187 г/л соответственно.

Таблица 9. 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	88±5 (80%)	81±5 (73%)	75±5 (68%)
	200	118±6 (53%)	100±7 (45%)	84±3 (38%)
	300	132±9 (40%)	113±7 (34%)	97±9 (29%)
СНХЦ	100	86±4 (78%)	82±5 (74%)	76±6 (69%)
	200	149±2 (67%)	118±9 (53%)	97±6 (44%)
	300	187±15 (56%)	163±8 (49%)	114±4 (34%)
ЩТ	100	79±4 (72%)	77±4 (69%)	72±4 (65%)
	200	133±7 (60%)	117±6 (53%)	94±4 (42%)
	300	164±13 (49%)	144±10 (43%)	121±9 (36%)

В случае действия препарата PV-ЭГ1-БГЛ концентрация ВС для 100 г/л любого субстрата составила 77–82 г/л, при 200 г/л субстрата концентрация ВС составила 100–118 г/л, при 300 г/л субстрата – 113–163 г/л. Предпочтительными субстратами для ФП PV-ЭГ1-БГЛ была СНХЦ и ЩТ.

При действии смеси Агроцелл Плюс с PV-БГЛ на 100 г/л любого субстрата концентрация ВС составила 72–76 г/л, при 200 г/л субстрата – 84–97 г/л, при 300 г/л субстрата – 97–121 г/л. Предпочтительными субстратами для данной смеси препаратов были СНХЦ и 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%, тогда как при гидролизе субстратов с исходной концентрацией 100 г/л – 65–80%.

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 реакционную 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 специфическим 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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus:

1. Семенова М.В. и др. Способы предобработки тростника для получения ферментативных гидролизатов с высоким содержанием сахаров / Семенова М.В., Рожкова А.М., Осипов Д.О., **Телицин В.Д.**, Рубцова Е.А., Кондратьева Е.Г., Васильева И.С., Морозова О.В., Ярополов А.И., Сеницын А.П. // Прикладная биохимия и микробиология. — 2024. — Т. 60, № 5. — С. 524–535. (объем п.л. 0,7, авторский вклад 35%) [Импакт-фактор РИНЦ = 1,4] doi: 10.31857/S0555109924050109 (Semenova M.V. et al. Methods for preprocessing reeds to obtain enzymatic hydrolysates with a high sugar contents / Semenova M.V., Rozhkova A.M., Osipov D.O., **Telitsin V.D.**, Rubtsova E.A., Kondrat`eva E.G., Vasil`eva I.S., Morozova O.V., Yaropolov A.I., Sinitsyn A.P. // Applied Biochemistry and Microbiology. — 2024. — Vol. 60, no. 5. — P. 931–941 [Импакт-фактор WOS JIF = 1,0] doi: 10.1134/S0003683824604736 (объем п.л. 0,6, авторский вклад 35%))
2. Shevchenko A.R. et al. Enzymatic hydrolysis of kraft and sulfite pulps: What is the best cellulosic substrate for industrial saccharification? / Shevchenko A.R., Mayorova K.A., Chukhchin D.G., Malkov A.V., Toptunov E.A., **Telitsin V.D.**, Rozhkova A.M., Zorov I.N., Rodicheva M.A., Plakhin V.A., Akishin D.A., Poshina D.N., Semenova M.V., Aksenov A.S., Sinitsyn A.P. // Fermentation. — 2023. — Vol. 9. — № 11. — P. 936. (объем п.л. 0,9, авторский вклад 30%) [Импакт-фактор WOS JIF = 3,7] doi: 10.3390/fermentation9110936
3. Shevchenko A.R. et al. Production of biomodified bleached kraft pulp by catalytic conversion using *Penicillium verruculosum* enzymes: Composition, properties, structure, and application / Shevchenko A.R., Tyshkunova I.V., Chukhchin D.G., Malkov A.V., Toptunov E.A., **Telitsin V.D.**, Rozhkova A.M., Sinitsyna O.A., Gofman I.V., Aksenov A.S. // Catalysts. — 2023. — Vol. 13, no. 1. — P. 103. (объем п.л. 0,8, авторский вклад 30%) [Импакт-фактор WOS JIF = 3,8] doi: 10.3390/catal13010103
4. Семенова М.В. и др. Биокаталитическое превращение полуфабриката лиственной древесины в сахара – проведение процесса ферментативного гидролиза при высокой концентрации субстрата / Семенова М.В., **Телицин В.Д.**, Рожкова А.М., Кондратьева Е.А., Шашков И.А., Сатрутдинов А.Д., Гареева Я.А., Мосеев В.Г., Кряжев А.М., Сеницын А.П. // Катализ в промышленности. — 2023. — Т. 23, № 4. — С. 75–83. (объем п.л. 0,5, авторский вклад 45%) [Импакт-фактор РИНЦ = 0,3] doi: 10.18412/1816-0387-2023-4-75-83 (Semenova, M.V. et al. Biocatalytic conversion of semi-finished hardwood into sugars: enzymatic hydrolysis at high concentrations of the substrate / Semenova, M.V., Telitsin, V.D., Rozhkova, A.M., Kondratyeva, E.G., Shashkov, I.A., Satrutdinov, A.D., Gareeva, Ya.A., Moseev, V.G., Kryazhev, A.M., Sinitsyn, A.P. // Catalysis in Industry. — 2024. — Vol. — 16. — no.1. — P.102-109. [Импакт-фактор WOS JIF = 0,9] doi: 10.1134/S2070050424010070 (объем п.л. 0,4, авторский вклад 45%))
5. Семёнова М.В. и др. Новый ферментный препарат, содержащий полисахаридмонооксигеназу и β-глюкозидазу - синергетические добавки к целлюлазам / Семенова М.В., Гусаков А.В., **Телицин В.Д.**, Матыс В.Ю., Бубнова Т.В., Немашкалов В.А., Рожкова А.М., Сеницын А.П. // Прикладная биохимия и микробиология. — 2022. — Т. 58, № 4. — С. 366–373. (объем п.л. 0,4, авторский вклад 40%) [Импакт-фактор РИНЦ = 1,4] doi: 10.31857/S0555109922040146 (Semenova M.V et al. A new enzyme preparation containing polysaccharide monooxygenase and

- beta-glucosidase — synergistic additives to cellulases / Semenova M.V., Gusakov A.V., **Telitsin V.D.**, Matys V.Y., Bubnova T.V., Nemashkalov V.A., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. // *Applied Biochemistry and Microbiology*. — 2022. — Vol. 58, no. 4. — P. 449–455. [Импакт-фактор WOS JIF = 1,0] doi: 10.1134/S0003683822040147 (объём п.л. 0,4, авторский вклад 40%)
6. Семёнова М.В. и др. Ферментативная деструкция целлюлозы: особенности кинетического взаимодействия литических полисахаридмонооксигеназ и индивидуальных целлюлаз / Семенова М. В., Гусаков А. В., **Телицин В. Д.**, Сеницын А. П. // *Прикладная биохимия и микробиология*. — 2021. — Т. 57, № 5. — С. 477–484. [Импакт-фактор РИНЦ = 1,4] doi: 10.31857/S0555109921050147 (объём п.л. 0,5, авторский вклад 35%) (Semenova M.V et al. Enzymatic destruction of cellulose: characteristics of the kinetic interaction of lytic polysaccharide monoxygenases and individual cellulases / Semenova M.V., Gusakov A.V., **Telitsin V.D.**, Sinitsyn A.P. // *Applied Biochemistry and Microbiology*. — 2021. — Vol. 57, no. 5. — P. 618–625. [Импакт-фактор WOS JIF = 1,0] doi: 10.1134/S0003683821050136 (объём п.л. 0,4, авторский вклад 35%))
 7. **Телицин В.Д.** и др. Использование 2,6-диметоксифенола для определения содержания полисахаридмонооксигеназы в мультиферментных препаратах / **Телицин В.Д.**, Семёнова М.В., Осипов Д.О., Гусаков А.В., Сеницын А.П. // *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. — 2020. — Т. 61, № 2. — С. 119–124. [Импакт-фактор РИНЦ = 0,8] doi: 10.3103/S0027131420020157 (объём п.л. 0,3, авторский вклад 75%) (**Telitsin V.D.** et al., 2,6-Dimethoxyphenol-based assay for quantitation of polysaccharide monoxygenase in multienzyme cocktails / **Telitsin V.D.**, Semenova M.V., Osipov D.O., Gusakov A.V., Sinitsyn A.P. // *Moscow University Chemistry Bulletin*. — 2020. — Vol. 75, no. 2. — P. 96–100. [Импакт-фактор WOS JIF = 0,7] doi: 10.3103/S0027131420020157 (объём п.л. 0,3, авторский вклад 75%))
 8. Semenova M.V. et al. Purification and characterization of two forms of the homologously expressed lytic polysaccharide monoxygenase (PvLPMO9A) from *Penicillium verruculosum* / Semenova M.V., Gusakov A.V., **Telitsin V.D.**, Rozhkova A.M., Kondratyeva E.G., Sinitsyn A.P. // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. — 2020. — Vol. 1868, no. 1. — P. 140297. (объём п.л. 0,5, авторский вклад 55%) [Импакт-фактор WOS JIF = 2,8] doi: 10.1016/j.bbapap.2019.140297
 9. Semenova M.V. et al. Enhancement of the enzymatic cellulose saccharification by *Penicillium verruculosum* multienzyme cocktails containing homologously overexpressed lytic polysaccharide monoxygenases / Semenova M.V., Gusakov A.V., Volkov P.V., Matys V.Y., Nemashkalov V.A., **Telitsin V.D.**, Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. // *Molecular Biology Reports*. — 2019. — Vol. 46, no. 2. — P. 2363–2370. (объём п.л. 0,4, авторский вклад 35%) [Импакт-фактор WOS JIF = 2,6] doi: 10.1007/s11033-019-04693-y