

УДК 663.15, 579.66

ПОЛУЧЕНИЕ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ КСИЛАНАЗЫ В ГРИБЕ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*. ПРИМЕНЕНИЕ ИХ В ГИДРОЛИЗЕ ОТХОДОВ ЛЕСНОЙ И ДЕРЕВООБРАБАТЫВАЮЩЕЙ ОТРАСЛЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

© 2010 г. **Д.О. Осипов**¹,
А.М. Рожкова¹, **В.Ю. Матыс**²,
А.В. Кошелев², **О.Н. Окунев**²,
Е.А. Рубцова³, **А.Г. Правиль-**
ников¹, **И.Н. Зоров**^{1,3},
О.А. Сеницына³, **И.Н. Овешников**⁴,
Е.Р. Давидов⁴, **А.П. Сеницын**^{1,3}

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино

³ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

⁴ ОАО «ГосНИИсинтезбелок»

Введение

В последние десятилетия особую актуальность приобрело развитие технологий получения альтернативных видов топлива. Причины этого — истощаемость природных источников топлива, растущие цены на нефть, высокие затраты на обустройство новых месторождений, а также возможные аварии при транспортировке и хранении традиционного топлива. Общемировой практикой становится ис-

пользование биотоплива разных видов, например, биоэтанола как альтернативного источника энергии. Сырье для биоэтанола — сбраживаемые сахара, образующиеся при гидролизе целлюлозосодержащих материалов (ЦСМ), преимущества которых — возобновляемость и низкая себестоимость. Биоэтанол в России получают, в основном, из зерна, содержащего крахмал. Однако, разработка технологии получения биотоплива на основе переработки отходов лесной и деревообрабатывающей промышленности также развивается в отечественной биотехнологии как параллельное направление, позволяющее говорить о конкурентоспособности конечного продукта — биоэтанола на мировом рынке биотоплива (признанными лидерами которого являются США, КНР).

Одной из основных стадий переработки ЦСМ является превращение сложных полисахаридов растительной клеточной стенки в сбраживаемые сахара, осуществляемое комплексом ферментов-карбогидраз, являющихся биокатализаторами этого процесса. Состав получаемых гидролизатов зависит как от состава комплекса осаживающих ферментов, так и от содержания сложных полисахаридов в гидролизуемых ЦСМ. Выбор ферментного

Осипов Д.О. — аспирант, и.о. мл. науч. сотрудник Института биохимии им. А.Н. Баха РАН.

Рожкова А.М. — канд. хим. наук, науч. сотрудник того же института. Тел.: (8 910) 464-47-91. E-mail: amrojkova@yahoo.com.

Матыс В.Ю. — мл. науч. сотрудник Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН.

Кошелев А.В. — науч. сотрудник того же института.

Окунев О.Н. — канд. биол. наук, зав. лабораторией того же института.

Рубцова Е.А. — канд. хим. наук, науч. сотрудник Института биохимии им. А.Н. Баха РАН.

Правильников А.Г. — аспирант того же института.

Зоров И.Н. — канд. хим. наук, науч. сотрудник химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Сеницына О.А. — науч. сотрудник того же университета.

Давидов Е.Р. — канд. тех. наук, зав. лабораторией «ГосНИИсинтезбелок».

Овешников И.Н. — науч. сотрудник того же института.

Сеницын А.П. — докт. хим. наук, зав. лабораторией химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

комплекса для эффективного гидролиза растительной биомассы разных видов во многом определяется составом входящих в тот или иной вид биомассы полисахаридов.

Клеточная стенка растений — высокоорганизованная структура, состоящая из целлюлозы, гемицеллюлоз, пектиновых веществ и лигнина. Основной полисахарид — целлюлоза (30–50 %). Гемицеллюлозы, доминирующий компонент которых представлен ксиланом, составляют значительную часть клеточной стенки растений (содержание арабиноксилана для однолетних растений — 20–40 % полисахаридов клеточной стенки, ацетилметилглюкуроноксилана для лиственных пород деревьев — 20–35 %, арабинометилглюкуроноксилана для хвойных пород — 10–15 %).

Нами было показано, что мутантный штамм низшего гриба *Penicillium verruculosum* является продуцентом секретируемого комплекса целлюлаз (включающего основные ферменты гидролиза целлюлозы — целлобиогидролазы и эндоглюканызы), способного к высокоэффективному гидролизу целлюлозы [1–5]. Однако в ферментном комплексе, продуцируемом этим грибом, недостаточно высок для гидролиза богатой ксиланами биомассы уровень ксиланазной активности [6]. Поэтому получение повышенно ксиланолитически активных и содержащих гомологичные или гетерологичные гены ксиланазы и маннаназы биокатализаторов на основе штамма *P. verruculosum* представляется актуальной задачей.

Мы установили, что гриб *P. canescens* является продуцентом эндо- β -1,4-ксиланазы (КФ 3.2.1.8, мол.масса 31 кДа, в дальнейшем — Ксил-31), высоко активной по отношению к глюкуроноксилану и арабиноксилану, а также проявляющей максимальную активность и стабильность в оптимальных условиях действия карбогидразного комплекса штамма *P. verruculosum* (50–55 °C, pH 4,5–5,5 [7]). Ген Ксил-31 был клонирован ранее [8].

Целью работы являлось создание биокатализаторов с использованием рекомбинантных штаммов *P. verruculosum* с увеличенной гетерологичной экспрессией эндо- β -1,4-ксиланазы *P. canescens*, анализ свойств новых ферментных препаратов, а также изучение осахаривающей способности этих препаратов при гидролизе растительного сырья — измельченной осиновой и обессмоленной сосновой древесины — отходов лесной и деревообрабатывающей промышленности.

Материалы и методы исследования

Штаммы микроорганизмов. *P. verruculosum* 221 — исходный штамм, продуцент целлюлазного комплекса; *P. verruculosum* 537 (*niaD*[–]) — мутант с дефектом в гене *niaD*, кодирующим фермент нитратредуктазу, реципиентный штамм для плазмидной трансформации; штамм *P. canescens* F178 — используется для выделения геномной ДНК — матрицы для амплификации гена Ксил-31.

Получение плазмидных конструкций и трансформация штамма-реципиента *P. verruculosum* 537. Нуклеотидная последовательность, соответствующая полноразмерному гену Ксил-31 *P. canescens* (*xylA*) была амплифицирована методом ПЦР, где в качестве матрицы использовалась геномная ДНК *P. canescens* F178, выделенная с помощью набора фирмы QIAGEN (США) по стандартным протоколам. Для амплификации последовательности использовали праймеры: XylPCASS-UpLIC: (CAAA CAGAAGCAACCGACACAATGGTTCAACTCAAGA CTGCT); XylPCASS-LowLIC: (GAGGAGAAGCCCCG GTAAAGCGCATTTGGCGATAG).

ПЦР проводили на приборе «MyCycler» («Bio Rad», США) по следующему протоколу: 95 °C, 5 мин, 1 цикл; 95 °C, 1 мин 30 с, 55 °C, 1 мин 68 °C, 2 мин, 20 циклов; 68 °C, 10 мин, 4 °C, 30 мин. Полученный ПЦР-продукт был клонирован в вектор pUC-SBNI (рис. 1, а) с использованием метода независимого лигирования [9]. Кратко, ПЦР продукт (~1,4 т.п.о.) был выделен из агарозного геля и очищен, используя набор реагентов фирмы QIAGEN. Далее ПЦР-продукт и линейаризованный вектор pUC-SBNI были обработаны T4-ДНК полимеразой («Fermentas», США) в присутствии деоксиаденозинтрифосфата dATP («Fermentas») и деокситимидинтрифосфата dTTP («Fermentas»), соответственно. Обработанная вставка была лигирована в pUC-SBNI-вектор смешиванием 50 нг вектора и 150 нг вставки. Смесь инкубировали 30 мин при 22 °C после чего трансформировали в клетки *E.coli* MACH1 (Invitrogene, США) по стандартному протоколу трансформации, описанному в лабораторных протоколах [10]. Так же была получена плазмида pPrSBNI-XylA (рис. 1, б). Отсутствие мутаций в гене ксиланазы было подтверждено секвенированием гена *xylA* по методу Сэнгера в обоих направлениях.

Трансформировали штамм-реципиент *P. verruculosum* 537 (*niaD*[–]) и получали протопласты в соответствии с модифицированной методикой для штамма *P. canescens* [11]. В качестве трансформиру-

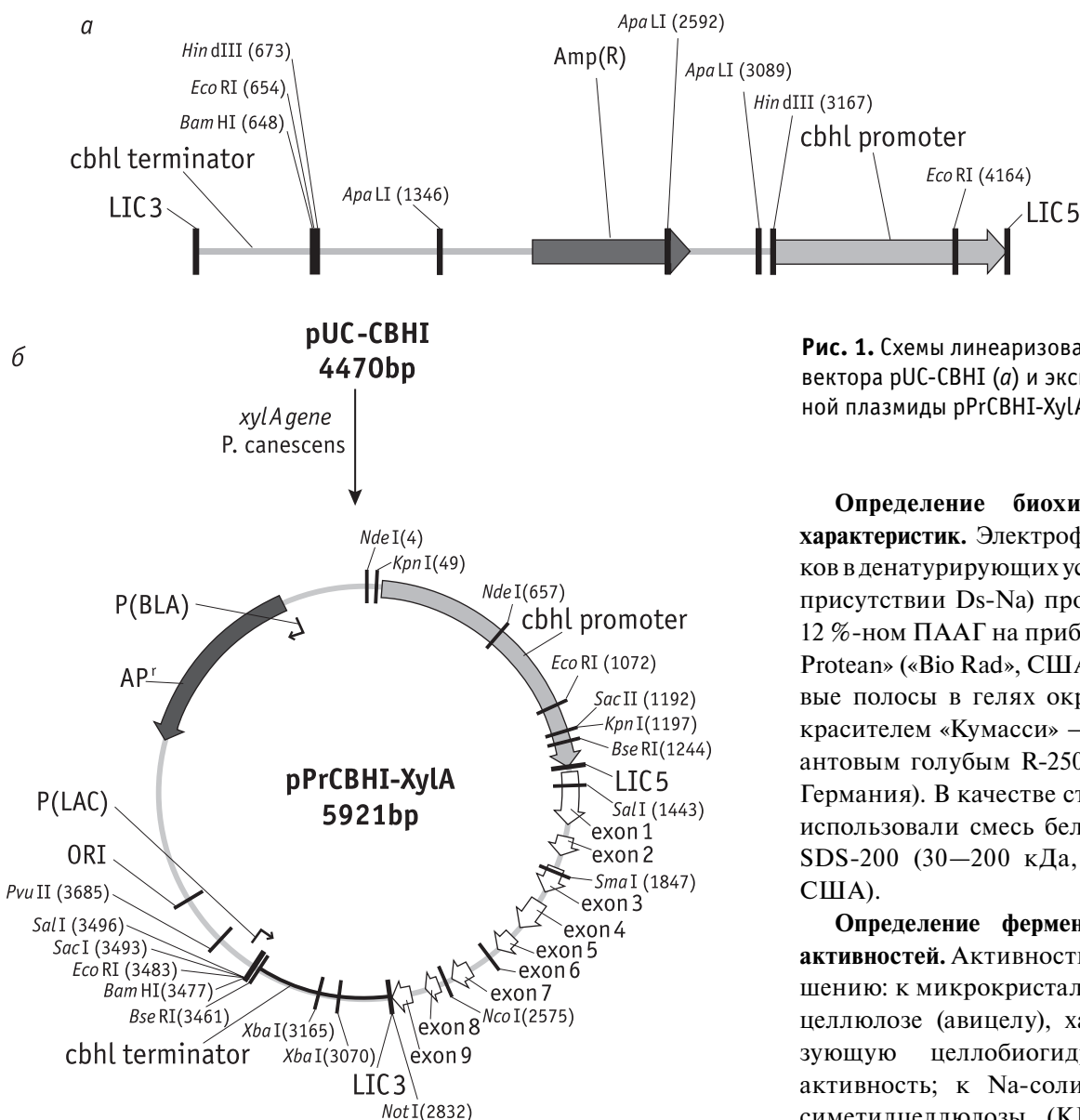


Рис. 1. Схемы линейаризованного вектора pUC-CBH1 (а) и экспрессионной плазмиды pPrCBH1-XylA (б)

Определение биохимических характеристик. Электрофорез белков в денатурирующих условиях (в присутствии Ds-Na) проводили в 12 %-ном ПААГ на приборе «Mini Protean» («Bio Rad», США). Белковые полосы в гелях окрашивали красителем «Кумасси» — бриллиантовым голубым R-250 («Ferak», Германия). В качестве стандартов использовали смесь белков MW-SDS-200 (30—200 кДа, «Sigma», США).

Определение ферментативных активностей. Активность по отношению: к микрокристаллической целлюлозе (авицелу), характеризующую целлюлогидролазную активность; к Na-соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), характеризующую

активность эндоглюканазы; к глюконооксиану березы, характеризующую ксиланазную активность, определяли при 50 °C и pH5 по начальной скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС), концентрацию ВС определяли методом Шомоди—Нельсона [12]. Концентрация полисахаридного субстрата в реакционной смеси составляла 5 г/л.

Ферментные препараты. Были использованы сухие препараты ферментов, полученные лиофильным высушиванием культуральных жидкостей исходного штамма *P. verruculosum* (PV-255) и рекомбинантных штаммов с гетерологичным геном ксиланазы *P. canescens* Ксил-31 (PV-1, PV-2, PV-3, PV-4, PV-5, PV-6, PV-7 и PV-8), выращенных в колбах на среде с пшеничными отрубями. Препараты получены в ИБФМ РАН (Пушино).

эндоглюканаза; к глюконооксиану березы, характеризующую ксиланазную активность, определяли при 50 °C и pH5 по начальной скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС), концентрацию ВС определяли методом Шомоди—Нельсона [12]. Концентрация полисахаридного субстрата в реакционной смеси составляла 5 г/л.

Активность ферментов по отношению к *n*-нитрофенил-β-D-глюкопиранозиду (ПНФГ) определяли по начальной скорости образования *n*-нитрофенола (ПНФ) по методике [13]. 0,05 М раствор субстрата в 0,1 М Na-ацетатном буфере, pH, инкубировали с ферментом при 40 °C в течение 10 мин. Реакцию останавливали, добавляя 1 М раствор Na₂CO₃. Обра-

зовавшийся в растворе ПНФ определяли спектрофотометрически при длине волны 400 нм, используя коэффициент молярного поглощения.

Целлюлазную активность определяли, инкубируя 2,5 мМ раствор целлюбозы с ферментом и отбирая пробы на глюкозу через 5, 10 и 15 мин. Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазно-пероксидазным методом [14].

Активность ферментов выражали в международных единицах (1 м.е. соответствует образованию 1 мкмоль продукта за 1 мин при действии ферментов на соответствующий субстрат).

Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта БСА.

Растительные субстраты. Были использованы: измельченные до 1–3-мкм частиц обессмоленная сосновая древесина, осиновая древесина и багасса (в ОАО «ГосНИИ биосинтеза белковых веществ» на планетарной мельнице-активаторе типа АГО-2С).

Гидролиз растительных субстратов. Эксперимент вели 2 сут. в термостатируемой при 50 °С ячейке, помещенной на качалку (thermo shaker) «INNOVA 40». Концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 100 г/л (в пересчете на сухое вещество), реакцию проводили в 0,1 М ацетатном буфере, при перемешивании 250 об./мин. Ферментный препарат добавляли в пересчете на белок (5 мг белка на 1 г сухого вещества субстрата). Конечный объем реакционной смеси составил 20 мл. В реакционную смесь добавляли также целлюлазный ферментный препарат F10 из расчета 40 ед. целлюлазной активности на 1 г сухого субстрата. Контрольным служил эксперимент, в котором вместо раствора ферментных препаратов добавляли в реакционную смесь соответствующее количество буферного раствора.

Реакционная ячейка представляла пластиковый сосуд с крышкой объемом 50 мл, для дополнительного перемешивания реакционной смеси в ячейку помещали металлический цилиндр ($d = 7$ мм, $h = 10$ мм) из коррозионностойкой стали.

Через определенное время (3, 12 и 24 ч) из реакционной смеси отбирали 0,5 мл пробы, центрифугировали 3 мин при 10000 об./мин и измеряли в супернатанте концентрацию ВС (методом Шомоди–Нельсона [12]) и глюкозы (глюкозооксидазно-пероксидазным методом [14]).

Анализ состава ферментных препаратов. Для фракционирования ферментных препаратов использовали хроматографическую систему FPLC, колонки и носители фирмы «Pharmacia» (Швеция),

для подготовки образцов, а также для их обессоливания и замены буфера — систему низкого давления «Econo-System» фирмы «Bio Rad». Ферментный препарат обессоливали на колонке с акрилексом П2 фирмы «Reanal» (Венгрия) в 20 мМ буфере пиперазин-НСl, pH = 5,5. Далее проводили анионообменную хроматографию на колонке с носителем «Source 15Q». Образец наносили в стартовом буфере Bis-Tris/HCl при pH = 6,8; связавшиеся белки элюировали градиентом концентрации NaCl. Несвязавшиеся с «Source 15Q» белки подвергали фракционированию с помощью гидрофобной хроматографии на колонке «Source 15ISO»; элюировали белки при начальной концентрации сульфата аммония 1,4 М в линейном ниспадающем градиенте (50 мМ NaAc, pH 5,0). В полученных в ходе элюирования фракциях определяли авицел-, КМЦ-, ксилан- и β-глюкозидазную активности, а также содержание белка.

Результаты и их обсуждение

Трансформация штамма *P. verruculosum* 537 и выбор препаратов для осахаривания. На первом этапе ген ксиланазы гриба *P. canescense* был клонирован в вектор, содержащий регуляторные элементы — промотор и терминатор гена целлюбогидролазы I, наиболее хорошо экспрессирующегося фермента в клетках гриба *P. verruculosum*. Так была получена целевая плазмида pPrCBHI-Xyl_PCA, которая трансформировалась в протопласты реципиентного штамма *P. verruculosum* 537 совместно с плазмидой pSTA10 в соотношении 10:1, мкг. Эффективность трансформации составляла 20–40 клонов на 1 мкг целевой ДНК, что соответствовало частоте трансформации грибов рода *Penicillium* [11].

Стабильные трансформанты выращивали 6 сут. в колбах на жидкой ферментационной среде, затем определяли в образцах культуральной жидкости авицел-, КМЦ-, β-глюкозид- и ксиланазную активности (данные не представлены). В результате первичного скрининга были отобраны восемь клонов, с наибольшей (по сравнению с контрольной) ксиланазной активностью и, кроме того, обладающих целлюлолитической активностью разных видов.

Отобранные клоны, а также исходный штамм *P. verruculosum* 221 были использованы для сухих ферментных препаратов. При ДДС-На-ПААГ-электрофорезе сухих препаратов рекомбинантных штаммов *P. verruculosum* в области 30 ± 2 кДа наблюдали полосу (на рис. 2 обозначена стрелкой), соответствующую

по молекулярной массе Ксил-31 и отсутствующую в исходном штамме *P. verruculosum* 221. Активности ферментных препаратов по отношению к разным субстратам приведены в табл. 1. Анализ электрофоретического разделения ферментных препаратов и их активность позволяет выявить две группы препаратов: первая — препараты PV-1, PV-2, PV-3 и PV-5, в которых преобладает Ксил-31 (мажорная полоса в области 30 ± 2 кДа, соответствующая Ксил-31, относительно высокая ксиланазная активность), при этом экспрессия ферментов целлюлитического комплекса снижена (уменьшение интенсивности полос в области 45–70 кДа, соответствующих целлобиогидролазам и эндоглюканазам *P. verruculosum*, относительно небольшие значения целлюлитической активности разных видов); вторая — препараты PV-4, PV-6, PV-7 и PV-8 — также характеризуется экс-

прессией Ксил-31 (но уменьшенной по сравнению с препаратами 1-й группы), при этом экспрессия ферментов целлюлитического комплекса по сравнению с 1-й группой увеличена.

Состав сухих ферментных препаратов. Было проведено двухстадийное аналитическое фракционирование полученных сухих препаратов PV-3 (препарат из 1-й группы), PV-4 (препарат из 2-й группы) и *P. verruculosum* 221 (исходный препарат). На первой стадии использовали анионообменную хроматографию на колонке «Source 15Q», на второй — несвязавшиеся на колонке «Source 15Q» белки разделяли с помощью гидрофобной хроматографии на колонке «Source 15ISO». Для всех препаратов фракционированию подвергали одинаковое количество белка (10 мг). В полученных фракциях определяли авицел-, КМЦ-, ксилан- и β -глюкозидазную активности, а также содержание белка. Зная общую целевую активность соответствующей фракции и общее содержание в ней белка, а также учитывая удельную активность соответствующих целевых ферментов (гомогенных целлобиогидролаз, эндоглюканаз, β -глюкозидазы, ксиланаз [6]), рассчитывали содержание соответствующего целевого фермента в общем пуле секретируемого белка. Отметим, что удельная активность гомогенной Ксил-31 *P. canescens* (31 кДа) составила 18 ед./мг белка [7].

В табл. 2 приведено компонентное содержание ферментных препаратов. В PV-3 наименьшее содержание целлобиогидролаз (38 % от общего пула белка) и эндоглюканаз (6 %) среди проанализированных, но наибольшее содержание Ксил-31 (50 %), в PV-4 увеличенное по сравнению с PV-3 содержание целлобиогидролаз и эндоглюканаз (47 и 10 % соответ-

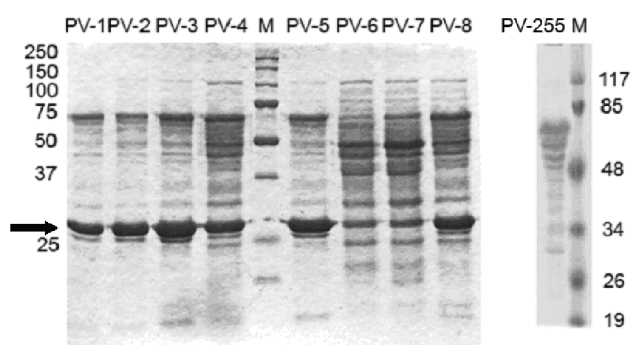


Рис. 2. Данные ДДС-На-ПААГ-электрофореза рекомбинантных ферментных препаратов (PV-1 – PV-8) и исходного штамма *P. verruculosum* 537 (PV-255); стандартный маркер для ДДС-На-ПААГ-электрофореза (М)

Таблица 1

Удельная активность сухих ферментных препаратов, ед./мг белка

Препарат	Белок, мг/г	Авицелаза	КМЦ-аза	β -глюкозидаза	Ксиланаз
PV-1	336	0,20	2,3	0,5	48,6
PV-2	298	0,20	2,5	0,5	69,6
PV-3	441	0,20	2,2	0,6	60,1
PV-4	516	0,25	4,2	3,3	43,8
PV-5	395	0,10	2,1	0,5	54,5
PV-6	661	0,10	3,9	3,1	22,5
PV-7	737	0,10	3,6	2,7	24,6
PV-8	619	0,10	3,7	2,3	40,3
PV-255 (контроль)	847	0,30	13,0	1,1	12,9

Таблица 2

Содержания ферментов в сухих ферментных препаратах (по данным FPLC-фракционирования), % от общего содержания белка

Препарат	Ферменты					
	целлобио- гидролазы	эндоглю- люканазы	β -глюко- зидазы	ксилаказы (гомологичные)	ксил-31 (гетерологичного)	др.
PV-3	38	6	1	2	50	3
PV-4	47	10	3	3	17	20
PV-255 (контроль)	60	15	2	1	–	22

венно), содержание Ксил-31 составило 17 %, наконец в исходном препарате PV-255 содержалось 60 % целлобиогидролаз и 15 % эндоглюканаз. Отметим, что содержание собственных ксиланаз в PV-3, PV-4 и PV-255 составило 2, 3 и 1 %, β -глюкозидазы — 1, 3 и 2 % соответственно. Полученные с помощью FPLC-фракционирования данные по составу ферментных препаратов коррелируют с данными табл. 1, отражающей активности ферментных препаратов по отношению к разным субстратам: препараты с увеличенным содержанием ксиланазы имеют увеличенную ксиланазную активность, с увеличенным содержанием целлобиогидролаз — увеличенную авицеллазную активность, с увеличенным содержанием эндоглюканаз — увеличенную КМЦ-азную активность.

Осахаривающая способность ферментных препаратов. Для сравнения гидролитической активности ферментных препаратов по отношению к разным видам растительных субстратов проводили гидролиз в присутствии целлобиазного ферментного препарата F10 (40 ед. целлобиазной активности на 1 г сухой массы субстрата) измельченных багассы, осиновой и сосновой древесины. Дозировка препаратов в реакционной смеси — 5 мг белка на 1 г сухой массы субстрата.

В качестве критерия осаживающей способности препаратов принимали выход *BC* и глюкозы через 24 ч после начала гидролиза. Результаты осаживания измельченных багассы, осины и сосны представлены на рис. 3, *a–в*. Очевидно, что препараты 2-й группы (PV-4, PV-6, PV-7, PV-8) по осаживающей способности превосходят препараты 1-й группы (PV-1, PV-2, PV-3 и PV-5), а также превосходят и контрольный препарат PV-255 (отметим, что препараты 1-й группы по осаживающей способности уступают контрольному препарату).

Наилучшей осаживающей способностью обладал препарат PV-4. Выход *BC* за 24 ч гидролиза измельченной багассы для него составил 37,7 г/л, глюкозы — 28,3 г/л, что на 10 и 17 % соответственно больше по сравнению с контрольным препаратом PV-255. Выход *BC* за 24 ч гидролиза измельченной осины для PV-4 составил 37,1 г/л, глюкозы — 27,9 г/л, что на 20 и 18 % соответственно больше по сравнению с контрольным препаратом. Выход *BC* за 24 ч гидролиза измельченной сосны для PV-4 составил 48,6, глюкозы — 37,7 г/л, что на 14 и 14 % соответственно больше по сравнению с контрольным.

Сопоставление данных по составу ферментных препаратов и значений их активностей позволяет объяснить преимущество препаратов 2-й группы (и, в частности, препарата PV-4) по сравнению с препаратами 1-й группы. Привнесение в препараты 2-й группы гетерологичной ксиланазы увеличило их ксиланазную активность, но в существенно меньшей степени затронуло собственный целлюлолитический комплекс гриба *P. verruculosum* и сохранило высокую целлюлазную активность (в первую очередь следует отметить незначительное по сравнению с исходным контрольным препаратом уменьшение содержания целлобиогидролаз). Уменьшение осаживающей способности препаратов 1-й группы происходит в результате значительного понижения уровня экспрессии целлобиогидролаз и эндоглюканаз.

Отметим, что использованные измельченные растительные субстраты по реакционной способности можно расположить в порядке: сосна > багасса > осина.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами были получены рекомбинантные штаммы гриба *P. verruculosum*, продуцирующие гетерологичную ксиланазу Ксил-31 *P. canescense*. С использованием этих штаммов удалось получить

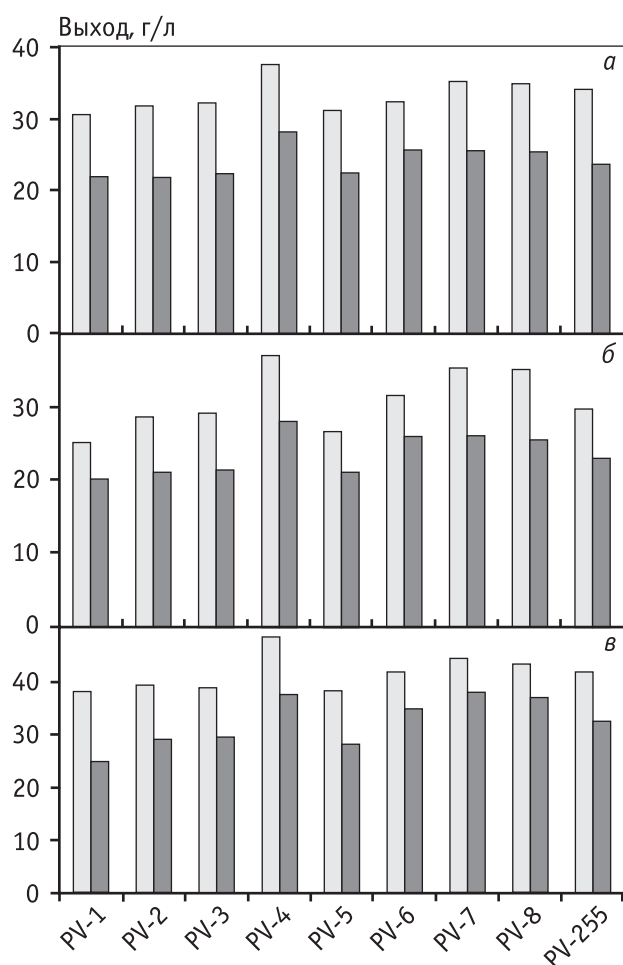


Рис. 3. Выход ВС (□) и глюкозы (■) при гидролизе измельченных багассы (а), осины (б), сосны (в)

Условия: 50 °С, pH = 5, перемешивание – 250 колебаний в минуту, [S] = 100 г/л (сухая масса), время гидролиза 24 ч. Дозировка ферментных препаратов по белку – 5 мг/г сухого субстрата, в реакцию смесь добавлена целлюбиаза – 40 ед. на 1 г сухого субстрата

ферментные препараты с увеличенной ксиланазой активностью при сохранении в значительной мере целлюлазной активности, что привело к общему увеличению осахаривающей способности растительного сырья по сравнению с контрольным препаратом (полученным при использовании исходного штамма *P. verruculosum*).

Заключение

Методами генетической инженерии были получены ферментные препараты—биокатализаторы для гидролиза отходов реального растительного сырья лесопильной и деревообрабатывающей промышлен-

ности. Уникальность разрабатываемой продукции состоит в получении биокатализаторов с заранее заданными свойствами, что значительно удешевляет ферментный препарат, исключая стадию смешивания отдельных компонентов карбогидразного комплекса для гидролиза растительного сырья—осиновой и сосновой древесины.

В октябре 2008 г. «Discovery Research Group» завершено исследование рынка лесозаготовки и лесопереработки в России. Ежегодный объем мирового производства лесопромышленной продукции составляет более 370 млрд. долл. США, 3 % этого объема приходится на долю России (10 млрд. долл.) По оценке ряда специалистов, общий запас древесины в России составляет порядка 82 млрд. м³ (более 22 % лесов планеты), в том числе более 58 млрд. м³ хвойных пород. Из общего объема заготавливаемой в России древесины 28–30 % в 2007 г. было экспортировано, что эквивалентно 50 млн м³. Причем в структуре экспорта древесины, по данным аналитиков, высокопереработанная древесина составляет около 20 %, остальное — пило- и круглые лесоматериалы.

В последнее время российские власти заинтересовались стимулированием глубокой переработки древесины на территории России, стремясь сократить экспорт леса-кругляка. Именно для этого были введены экспортные пошлины на необработанную древесину, что привело к накоплению ЦСМ внутри страны. Вопрос переработки растительного сырья в полезные продукты стоит особенно остро. Существует ряд целевых государственных программ, финансирующих как создание технологической платформы биоконверсии ЦСМ в целом, так и внедрение современных отечественных научных разработок на разных стадиях утилизации растительного сырья. Отметим, что использование ферментных препаратов, полученных в результате нашей работы, удешевит технологический процесс переработки растительного сырья и увеличит выход полезных продуктов.

Данная работа была выполнена при частичной финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (2009–2013 гг.) и программы ПНР-5.

Литература

1. Castellanos O. F., Sinitsyn A. P., Vlasenko E. Yu. Comparative evaluation of hydrolytic efficiency toward microcrystal-

- line cellulose of *Penicillium* and *Trichoderma* cellulases // *Bioresource Technol.* 1995. Vol. 52. P. 119.
2. Скомаровский А.А., Гусаков А.В., Окунев О.Н. и др. Гидролитическая способность ферментных препаратов из грибов родов *Penicillium* и *Trichoderma* // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 2. С. 210.
 3. Скомаровский А.А., Марков А.В., Гусаков А.В. и др. Новые целлюлазы для высокоэффективного гидролиза лигноцеллюлозной биомассы // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 6. С. 674.
 4. Berlin A., Gilkes N., Kilburn D. et al. Evaluation of novel fungal cellulases for ability to hydrolyze softwood substrates-evidence for the role of accessory enzymes // *Enzyme Microb. Technol.* 2005. Vol. 37. P. 175.
 5. Kurabi A., Berlin A., Gilkes N. et al. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded and ethanol organosolv-pretreated Douglas fir by novel and commercial funded celluloses // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2005. Vol. 121–124. P. 219
 6. Скомаровский А.А. Компонентный состав и гидролитическая способность ферментного комплекса *Penicillium verruculosum*: Автореф. канд. дис... канд. хим. наук, М.: МГУ, 2006.
 7. Синицына О.А., Гусаков А.В., Окунев О.Н. и др. Рекомбинантная эндо- β -1,4-ксилаза *Penicillium canescens* // *Биохимия* 2003. Т. 68. Вып. 1. С. 1631.
 8. Пат. 2288267 (РФ). 2006.
 9. Aslanidis C., de Jong J.P. // *Nucl. Acids Research.* 1990. Vol. 18. P. 6069.
 10. Sambrook J., Russell D. 3^d ed. (2001) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 11. Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V., Clutterbuck A.J. // *Curr. Genet.* 1995. Vol. 28. P. 474.
 12. Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. // Методы исследования и свойства целлюлолитических ферментов. М.: ВИНТИ, 1990. Т. 25. С. 30.
 13. Короткова О.Г., Семенова М.В., Морозова В.В. и др. Выделение и свойства грибных β -глюкозидаз // *Биохимия*, 2009. Т. 74. Вып. 5. С. 699.
 14. Березин К.В., Рабинович М.Л., Синицын А.П. // *Биохимия*. 1977. Т. 42. № 9. С. 1631.

УДК 663.1 + 547.262 + 547.264

БИОКАТАЛИЗАТОРЫ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРОЦЕССАХ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЭТАНОЛА И БИОБУТАНОЛА

© 2010 г. Е.Н. Ефременко^{1,2},
Н.А. Степанов^{1,2},
А.Б. Никольская²,
О.В. Сенько¹, О.В. Спиричева¹,
С.Д. Варфоломеев^{1,2}

¹ Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова² Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

Введение

Иммобилизация клеток микроорганизмов означает любое ограничение свободы перемещения их в пространстве, достигаемое применением разных носителей для клеток. Иммобилизация позволяет создавать и поддерживать высокие концентрации клеток в реакционных средах при биотехнологических процессах, повышать их скорости, а также

стабильность функционирования клеток, многократно и продолжительно использовать их, переходить к организации непрерывных технологических процессов [1]. Применение биокатализаторов иммобилизованных форм клеток микроорганизмов в разных процессах получения биотоплив — инновационный подход к решению задач по интенсифика-