

Результаты работы по производству антрахинона в кипящем слое будут опубликованы во второй части статьи в журнале «Катализ в промышленности».

## Литература

1. *Полотнюк О.-В.Я.* Аэродинамические аспекты повышения эффективности технологических процессов. Современные проблемы механики гетерогенных сред, Сборник трудов конференции к 15-летию основания. М.: ИПРИМ РАН. 2005. Т. II. С. 236—242.
2. *Ворожцов Н.Н.* Основы синтеза промежуточных продуктов и красителей, М.: Госхимиздат. 1955. С. 633.
3. *Куршева Г.А., Полотнюк О.Я., Конышева Л.И., Ежкова З.И., Зайцев Б.Е.* Кинетика и катализ. 13. 459 (1972).
4. *Шерман Ю.Г., Широков И.И.* и др. А.с. 170470 (1956); Бюлл. изобр. № 9, 17 (1965).
5. *Куршева Г.А., Полотнюк О.Я., Широков И.И.* Исследование активности компонентов катализатора окисления антрацена. Анилинокрасочная промышленность. В. 1. 29—33 (1970).
6. *Куршева Г.А., Полотнюк О.Я., Нефедов В.А.* Анилинокрасочная промышленность (НИОПиК). В. 2. 11 (1966).
7. *Кудрявцева Г.А., Полотнюк О.Я.* Анилинокрасочная промышленность (НИОПиК). В. 1. 10 (1973).
8. *Кудрявцева Г.А., Полотнюк О.Я.* Анилинокрасочная промышленность (НИОПиК). В. 1. 18 (1973).
9. *Кудрявцева Г.А.* Изучение парофазного каталитического окисления антрацена в антрахинон. Дис. ... канд. хим. наук. 1974.

УДК 602.3 : 633/635

## ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ «ФЬЮЖН» ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* ДЛЯ КОНВЕРСИИ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕЙ БИОМАССЫ

© 2013 г. **О.В. Проскурина**<sup>1</sup>,  
**О.Г. Короткова**<sup>2</sup>,  
**А.М. Рожкова**<sup>2</sup>, **В.Ю. Матыс**<sup>3</sup>,  
**А.В. Кошелев**<sup>3</sup>, **О.Н. Окунев**<sup>3</sup>,  
**В.А. Немашкалов**<sup>3</sup>,  
**О.А. Сеницына**<sup>1</sup>,  
**А.П. Сеницын**<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино

## Введение

Россия обладает богатейшими в мире запасами леса, в больших объемах ведется лесозаготовка и деревообработка (в 2012 г. объем лесозаготовок в России составил 169 млрд. м<sup>3</sup>). На лесосеках и производственных площадях скапливается большое количество отходов — опилок, веток, неделовой дре-

весины; общий объем древесных отходов в 2012 г. составил 75 млн. т [1]. Поэтому разработка эффективных способов использования древесной биомассы и отходов ее переработки является одной из наиболее приоритетных задач современной биотехнологии. Создаваемые в настоящее время технологии ис-

пользования биомассы во многом основываются на ферментативной деструкции составляющих растительное сырье полисахаридов до олиго- и моносахаридов, которые далее могут быть конвертированы с помощью микробного или химического синтеза в различные широко востребованные продукты (спирты, органические и аминокислоты, полимеры, кормовые добавки и многие другие продукты [2, 3]).

Целлюлоза (наряду с гемицеллюлозами) является одним из основных полисахаридов древесины. Ферментативный гидролиз целлюлозы катализируется ферментами целлюлазного комплекса, в состав которого входят эндоглюканазы, целлобиогидролазы и  $\beta$ -глюкозидазы [4]. Эндоглюканазы действуют на внутренние связи полисахаридной цепи целлюлозы и таким образом значительно уменьшают степень ее полимеризации; целлобиогидролазы атакуют концевые группы целлюлозы с образованием целлобиозы;  $\beta$ -глюкозидазы превращают целлобиозу в глюкозу, при этом они не только обеспечивают получение конечного продукта — глюкозы, но и способствуют снятию ингибирования целлюлаз целлобиозой, и повышают общую эффективность деструкции целлюлозы [5].

Эффективность биокаталитической конверсии целлюлозы во многом зависит от сбалансированности состава целлюлазного комплекса, поэтому поиск новых продуцентов целлюлаз для создания высокоэффективных целлюлазных ферментных препаратов был и остается важной задачей.

В настоящее время на мировом рынке представлено большое количество коммерческих препаратов целлюлаз, которые получены в основном с ис-

пользованием грибов рода *Trichoderma* в качестве продуцентов [4, 6–8]. При этом следует отметить, что целлюлазный комплекс *Trichoderma* не является сбалансированным (в первую очередь, он является дефицитным по  $\beta$ -глюкозидазе), что препятствует достижению максимальной эффективности гидролиза целлюлозосодержащего сырья.

Ранее нами было показано, что мутантный штамм низшего гриба *P. verruculosum* является перспективным продуцентом активного комплекса целлюлаз. Ферменты комплекса *P. verruculosum* обладают высокой активностью по отношению к полисахаридным субстратам, кроме того, преимуществом гриба *P. verruculosum* является высокая секреторная способность (40–50 г/л внеклеточного белка) [9–11].

В состав ферментного комплекса *P. verruculosum* входят несколько эндоглюканаз и целлобиогидролаз [11], в том числе такие высокоактивные ферменты, как эндоглюканаза II (ЭГ II) и целлобиогидролаза I (ЦБГ I), относящиеся к 5-й и 7-й семьям гликозид гидролаз соответственно. Преимуществом ЭГ II является высокая активность и стабильность (по этим параметрам ЭГ II превосходит эндоглюканазы *Trichoderma*). ЭГ II способна значительно уменьшать степень полимеризации целлюлозы и тем самым снижать вязкость растительного сырья при проведении ферментативного гидролиза. Преимуществом ЦБГ I является ее способность (даже при использовании в индивидуальном виде, в отсутствие других ферментов целлюлазного комплекса) осуществлять глубокую конверсию кристаллической целлюлозы до целлобиозы. Ферментный комплекс *P. verruculosum* обладает собственной  $\beta$ -глюкозидазой, однако активность этого фермента недостаточна, поэтому  $\beta$ -глюкозидазу при гидролизе растительного сырья вводят в реакционную смесь дополнительно [11].

Таким образом, увеличение содержания наиболее высокоактивных ферментов — ЭГ II и ЦБГ I, а также  $\beta$ -глюкозидазы в ферментном комплексе *P. verruculosum* может повысить эффективность гидролиза целлюлозы. Создание штаммов *P. verruculosum*, продуцирующих ферментный комплекс с повышенным содержанием ЭГ II, ЦБГ I и  $\beta$ -глюкозидазы, является важным шагом на пути получения промышленных штаммов — продуцентов ферментов для эффективной биокаталитической переработки растительной биомассы. Наиболее распространенным методом получения штаммов-продуцентов целевых белков является использование экспрессионных

---

**Проскурина О.В.** – аспирант химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Тел.: (495) 939-59-66. E-mail: olgavproskurina@gmail.com.

**Короткова О.Г.** – науч. сотрудник Института биохимии им. А.Н. Баха РАН. Тел.: (495) 954-27-32 E-mail: littletempo@yandex.ru.

**Рожкова А.М.** – канд. хим. наук, науч. сотрудник того же института. Тел. тот же. E-mail: amrojko@yahoо.com.

**Матыс В.Ю.** – мл. науч. сотрудник Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина. E-mail: sorve@rambler.ru.

**Кошелев А.В.** – науч. сотрудник того же института. E-mail: koshelyan@rambler.ru.

**Окунев О.Н.** – канд. биологич. наук, зав. сектором того же института. E-mail: oleg\_pokunev@rambler.ru.

**Немашкалов В.А.** – мл. науч. сотрудник того же института. E-mail: vitalianik@rambler.ru.

**Синицына О.А.** – канд. хим. наук, науч. сотрудник химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Тел.: (495) 939-59-66. E-mail: oasinitsyna@gmail.com.

**Синицын А.П.** – д-р хим. наук, зав. лабораторией того же университета. Тел. тот же. E-mail: apsinityn@gmail.com

плазмид на основе регуляторных элементов — промоторов и терминаторов генов наиболее хорошо экспрессирующихся, так называемых «мажорных» белков. Методами рекомбинантных ДНК ген целевого фермента помещается между нетранслируемыми участками гена «мажорного» секретируемого белка, и в результате гомологичной рекомбинации происходит встраивание целевого гена в хромосому гриба. Такая система экспрессии дает значимое количество целевого белка, она стабильна и индуцибельна.

Целью данной работы являлось:

— получение штаммов *P.verruculosum* с использованием фьюжн-системы экспрессии, с повышенной гомологичной экспрессией ЭГ II и ЦБГ I, а также с увеличенной гетерологичной экспрессией  $\beta$ -глюкозидазы *Aspergillus niger*;

— изучение свойств и определение состава новых ферментных препаратов, полученных с помощью новых рекомбинантных штаммов, а также изучение каталитической активности этих препаратов при гидролизе микрокристаллической целлюлозы (МКЦ), измельченной осиновой древесины и обесмоленной измельченной сосновой древесины.

## Материалы и методы исследования

**Штаммы микроорганизмов.** *P.verruculosum* 151 — исходный штамм, продуцент целлюлазного комплекса; *P.verruculosum* 537 (*niaD*<sup>-</sup>) — ауксотрофный штамм с дефектом в гене *niaD*, кодирующим фермент нитратредуктазу, реципиентный штамм для трансформации; штамм *A.niger* — использован для выделения геномной ДНК, которая являлась матрицей для амплификации гена  $\beta$ -глюкозидазы (*bglI*).

**Получение фьюжн-конструкции и трансформация штамма-реципиента *P.verruculosum* 537.** Фьюжн-конструкция, состоящая из последовательно соединенных генов целлюлаз —  $\beta$ -глюкозидазы (*bglI*), эндо-1,4- $\beta$ -глюканазы (*eglII*) и целлобиогидролазы I (*cbhI*) была получена следующим образом: нуклеотидные последовательности, соответствующие полноразмерным генам эндо-1,4- $\beta$ -глюканазы (*eglII*) и  $\beta$ -глюкозидазы (*bglI*) были амплифицированы методом ПЦР, где в качестве матрицы использовали геномные ДНК штаммов *P.verruculosum* и *A.niger* соответственно. Нуклеотидные последовательности, соответствующие промоторному региону гена целлобиогидролазы, а также полноразмерному гену целлобиогидролазы I (*cbhI*) совместно с терминальной областью гена *cbhI*, были амплифицирова-

ны методом ПЦР с использованием геномной ДНК штамма *P.verruculosum*. Геномные ДНК штаммов *P.verruculosum* и *A.niger* выделялись с помощью набора фирмы QIAGEN (США) по стандартным протоколам. Четыре амплифицированных ПЦР-фрагмента были выделены из агарозного геля с использованием стандартных методик солиubilизации и очистки ДНК в соответствии с рекомендациями фирмы QIAGEN (США). Далее методом ПЦР амплифицировали нуклеотидную последовательность, схематично представленную на рис. 1, представляющую собой фьюжн-конструкцию, состоящую из последовательно соединенных целевых генов *bglI*, *eglII* и *cbhI*, находящихся под контролем единого индуцибельного промотора *cbhI*. В качестве матрицы для ПЦР использовали смесь четырех очищенных ПЦР-фрагментов, взятых в эквимольном количестве. Общий размер конструкции составил  $\approx 7700$  п.о. Отсутствие мутаций во фьюжн-конструкции было подтверждено секвенированием всей полинуклеотидной последовательности по методу Сэнгера в обоих направлениях.

Трансформацию штамма-реципиента *P.verruculosum* 537 (*niaD*<sup>-</sup>) и получение протопластов проводили в соответствии с модифицированной методикой, разработанной для штамма *P.canescens* [12]. Трансформацию проводили линейной формой фьюжн-конструкции в количестве 3 мкг ДНК на трансформационную точку. В качестве трансформирующей использовалась плаزمида pSTA10, несущая ген нитратредуктазы, обеспечивающий комплементацию дефектного гена *niaD* в реципиентном штамме, что позволяло вести отбор трансформантов на среде с нитратом натрия.

**Ферментные препараты.** В работе были использованы сухие ФП, полученные ультрафильтрацией и лиофильным высушиванием культуральных жидкостей исходного штамма *P.verruculosum* (PV-151) и рекомбинантных штаммов, трансформированных плазмидой, несущей фьюжн-конструкцию, культивированных в ферментерах на средах с микрокристаллической целлюлозой (МКЦ). Препараты получены в ИБФМ РАН (г. Пушкино).



**Рис. 1.** Схема фьюжн-конструкции, используемой для трансформации штамма-реципиента *P.verruculosum* 537 (*niaD*<sup>-</sup>)

**Субстраты.** В качестве субстратов для определения гидролитической способности препаратов использовали МКЦ («Витэк», Украина), натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), глюкуроноксилан березы, *n*-нитрофенил- $\beta$ -*D*-глюкопиранозид (ПНФГ), целлобиозу (Sigma, США), измельченные на лабораторной планетарной мельнице-активаторе АГО-2, обессмоленную сосновую и осиную древесину (предоставлены ОАО «ГосНИИСинтезбелок»).

**Определение ферментативных активностей.** Определяли активности по следующим субстратам: МКЦ, КМЦ, глюкуроноксилану березы, ПНФГ, целлобиозе. Активность по отношению к МКЦ (авицеллазная активность, характеризует активность целлобиогидролаз) определяли при 40 °С и pH = 5,0 по начальной скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС). Активность по отношению к КМЦ (характеризует активность эндоглюканаз) и к глюкуроноксилану березы (характеризует активность ксиланаз) определяли при 50 °С и pH = 5,0 по начальной скорости образования ВС. Концентрация полисахаридных субстратов в реакционной смеси составляла 5 г/л. Концентрацию ВС определяли методом Шомоди — Нельсона. [13]

Активность по ПНФГ (характеризует активность  $\beta$ -глюкозидаз) определяли по начальной скорости образования *n*-нитрофенола (ПНФ). Раствор 0,05 М субстрата в 0,1 М Na-ацетатном буфере, pH = 5,0, инкубировали с ферментом при 40 °С в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением раствора 1М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Образовавшийся в растворе ПНФ определяли спектрофотометрически при длине волны 400 нм, используя коэффициент молярного поглощения ( $\epsilon = 18300 \text{ моль} \cdot \text{см}^{-1}$ ) [13].

Целлобиазную активность определяли по начальной скорости образования глюкозы из целлобиозы. Инкубировали 2,5 мМ раствор целлобиозы с ферментом, отбирали пробы через 5, 10 и 15 мин и определяли концентрацию глюкозы в них глюкозооксидазно-пероксидазным методом [13].

Активность ферментов выражали в международных единицах: 1 единица 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 [14].

**Определение биохимических характеристик.** Массы белков в препаратах и во фракциях после хроматографии определяли методом электрофореза в денатурирующих условиях. Электрофорез проводили

в присутствии додецилсульфата натрия 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).

**Проведение гидролиза растительных субстратов.** Реакционная ячейка представляла собой пластиковую пробирку вместимостью 2 мл с закручивающейся крышкой, для обеспечения дополнительного перемешивания реакционной смеси в ячейку помещали магнитный шарик. Эксперимент проводили при температуре 50 °С при постоянном перемешивании (1000 об./мин), использовали термошейкер BIOSAN TS-100 (Латвия). Реакцию проводили в 0,1 М Na-ацетатном буфере, pH = 5,0, концентрация субстрата составляла 100 г/л (в пересчете на сухое вещество), конечный объем реакционной смеси составлял 1,5 мл. Гидролиз проводили в течение двух суток. Через 3, 24 и 48 ч из реакционной смеси отбирали пробы (50 мкл), в которых определяли концентрацию ВС и глюкозы. ФП добавляли из расчета 2, 5, 10 мг белка на 1 г сухого вещества субстрата. При проведении гидролиза смесями ФП добавляли 5 мг белка на 1 г субстрата ФП на основе исходного штамма *P.verruculosum* и 2 мг белка на 1 г субстрата ФП на основе рекомбинантного штамма. В качестве контрольного в этом случае был использован ФП на основе исходного штамма *P.verruculosum*, добавленный из расчета 5 и 7 мг белка на 1 г субстрата. Эксперименты по гидролизу растительных субстратов повторяли трижды, на рисунках представлены усредненные экспериментальные данные, отклонение экспериментальных результатов от среднего значения не превышало 5 %.

**Анализ состава ФП.** Качественный и количественный состав ФП определяли хроматографическим методом. Навеску ФП растворяли в 0,1 М Na-ацетатном буфере, pH = 5,0, центрифугировали и обессоливали с заменой буфера с помощью гель-проникающей хроматографии на носителе Bio-Gel P-6 фирмы Bio-Rad (США) в 20 мМ буфере Bis-Tris/HCl, pH = 6,9. Подготовленные таким образом ФП фракционировали с помощью FPLC-системы фирмы Pharmacia (Швеция) на анионообменном носителе Source 15Q (Amersham Biosciences, Швеция), вместимость колонки — 1 мл. Образец наносили в стартовом буфере Bis-Tris/HCl при pH = 6,9; связавшиеся белки элюировали градиентом концентрации NaCl от 0 до 0,4 М. В полученных в ходе элюирования

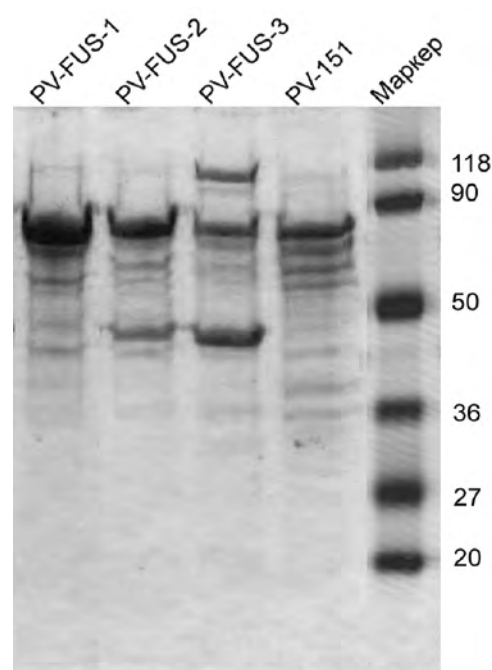
фракциях, а также в несвязавшейся фракции определяли авицелазную, КМЦазную, ксиланазную и  $\beta$ -глюкозидазную активности, содержание белка. Молекулярную массу белков во фракциях определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (ДДС-ЭФ).

## Результаты и их обсуждение

**Получение ферментных препаратов.** Методами генетической инженерии и микробиологии в исходный штамм-продуцент *P.verruculosum* были трансформированы экспрессионные конструкции, несущие фьюжн-гены ЭГ II и ЦБГ I *P.verruculosum*, а также  $\beta$ -глюкозидазы *A.niger* (*bglI*). В результате скрининга были отобраны штаммы, обладающие целевыми активностями, которые были использованы нами для дальнейшей наработки сухих ФП после ферментации в однолитровых ферментерах.

В качестве контрольного был использован ФП, полученный с помощью исходного штамма *P.verruculosum* PV-151. Результаты ДДС-ЭФ новых ФП представлены на рис. 2.

Авицелазная, КМЦазная,  $\beta$ -глюкозидазная и целлюбиазная активности рассматриваемых ФП и содержание белка в них представлены в табл. 1. Как следует из данных, были получены препараты трех типов. ФП PV-FUS-1, обладающий высокой активностью по МКЦ по сравнению с контрольным препаратом PV-151 и характеризующийся заметным усилением полосы в районе 66 кДа на электрофореграмме (что соответствует ЦБГ I). Второй тип ФП (PV-FUS-2) проявлял повышенную по сравнению с контрольным ФП активность по двум субстратам: КМЦ и МКЦ. На электрофореграмме ФП PV-FUS-2 заметно усиление двух полос, соответствующих ЦБГ I и ЭГ II (см. рис. 2). Третий тип ФП (PV-FUS-3) обладал высокими активностями по КМЦ, МКЦ и ПНФГ, превышающими эти значения для контрольного ФП PV-151. Помимо усиления полос на электрофореграмме, соответствующих ЦБГ I и ЭГ I,



**Рис. 2.** Электрофореграммы ФП на основе рекомбинантных и исходного штамма *P.verruculosum*. ФП PV-FUS-1 характеризуется интенсивной полосой ЦБГ I (66 кДа); ФП PV-FUS-2 имеет две мажорные полосы – ЦБГ I и ЭГ II (50 кДа); ФП PV-FUS-3 имеет три мажорные полосы – ЦБГ I, ЭГ II и  $\beta$ -глюкозидазы *A.niger* (116 кДа)

заметно появление полосы в районе 116 кДа, которая указывает на наличие  $\beta$ -глюкозидазы *A.niger* (на это указывает также увеличение активности по целлюбозе более чем в 10 раз по сравнению с контрольным ФП, см. табл. 1).

Таким образом, вследствие трансформации фьюжн-конструкции в штамм-продуцент гриба *P.verruculosum* был получен ряд новых ФП с различными свойствами и, очевидно, с различным содержанием ЭГ II, ЦБГ I и  $\beta$ -глюкозидазы.

**Состав сухих ФП.** Препараты были фракционированы на анионообменном носителе для определения их качественного и количественного состава. В полученных фракциях определяли содержание белка и следующие активности: авицелазную, КМЦаз-

Таблица 1

### Содержание белка и активность сухих ФП, ед./г

Препарат	Белок, мг/г	КМЦаза	Авицелаз	$\beta$ -Глюкозидаза	Целлюбиаза
PV-FUS-1	620	6041	<b>240</b>	720	167
PV-FUS-2	591	<b>14591</b>	<b>170</b>	369	124
PV-FUS-3	613	<b>26637</b>	<b>162</b>	<b>5994</b>	<b>5764</b>
PV-151	834	8129	90	1041	305

Таблица 2

**Содержание ферментов в сухих ФП (по данным FPLC-фракционирования), % от общего содержания белка**

Препарат	Содержание ферментов, %			
	PV-151	PV-FUS-1	PV-FUS-2	PV-FUS-3
ЦБГ I 66кДа	20	<b>66</b>	<b>56</b>	<b>37</b>
ЦБГ I 55кДа	15	9	4	3
ЦБГ II 60кДа	17	7	5	1
ЦБГ II 50кДа	17	3	3	1
ЭГ 39кДа	3	<1	<b>19</b>	<b>34</b>
$\beta$ -Глюкозидаза (гетерологичная), 116 кДа	–	–	–	<b>12</b>
$\beta$ -Глюкозидаза (гомологичная), 118 кДа	4	3	2	2
Другие белки	24	12	11	10

ную, ксиланазную и  $\beta$ -глюкозидазную. Проводили ДДС-ЭФ фракций для определения молекулярных масс белков, содержащихся в каждой фракции. Исходя из общей активности соответствующих фракций и содержания в них белка, рассчитывали содержание того или иного фермента в препарате. Содержание целевых ферментов в ФП приведено в табл. 2.

Препарат PV-FUS-1 содержал преимущественно ЦБГ I: общее содержание его в препарате составляло 73 % от общего содержания белка в ФП. Этот фермент представлен в двух формах: в тяжелой, с молекулярной массой 66 кДа (66 % от общего содержания белка), и легкой, с молекулярной массой 50 кДа (7 %), представляющей, по-видимому, лишенную целлюлозосвязывающего модуля ЦБГ I. Значительных количеств других рекомбинантных белков обнаружено не было.

Согласно данным FPLC-фракционирования, ФП PV-FUS-2 содержал два мажорных белка — ЦБГ I 66 кДа (56 % от общего содержания белка) и ЭГ II (19 %).

В ФП PV-FUS-3 представлены три мажорных компонента — это рекомбинантные белки — ЦБГ I (37 %), ЭГ II (34 %) и  $\beta$ -глюкозидаза *A.niger* 116 кДа (12 %), обнаружены также незначительные количества других ферментов.

Контрольный ФП PV-151 имел в своем составе 69 % различных целлюбиогидролаз (ЦБГ I 66 кДа —

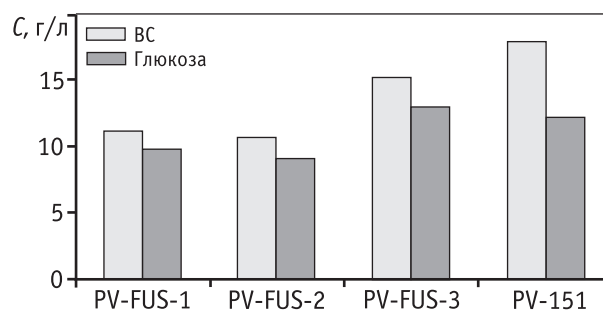
20 %, ЦБГ I 55 кДа — 18 %, ЦБГ II 60 кДа — 20 %, ЦБГ II 50 кДа — 10 %), 16 % различных эндоглюканаз, 4 % собственной (гомологичной)  $\beta$ -глюкозидазы и 3 % ксиланаз.

Таким образом, нами были получены ФП препараты трех типов: ФП PV-FUS-1, содержащий в основном ЦБГ I; ФП PV-FUS-2, содержащий ЦБГ I и ЭГ II; ФП PV-FUS-3, состоящий преимущественно из ЦБГ I, ЭГ II и  $\beta$ -глюкозидазы *A.niger*. При этом новые рекомбинантные ФП не содержали в значительных количествах другие ферменты, которые секретируются исходным штаммом *P.verruculosum* PV-151.

Активности рекомбинантных ФП по отношению к различным субстратам, приведенные в табл. 1, коррелируют с данными FPLC-фракционирования. Высокая авицеллазная активность препарата PV-FUS-1 объясняется содержанием большого количества целлюбиогидролазы I (66 %). Препарат PV-FUS-2 проявлял помимо высокой активности по отношению к МКЦ высокую активность к КМЦ, что подтверждается наличием в его составе в качестве мажорных компонентов ЦБГ I и ЭГ II. Препарат PV-FUS-3, содержащий ЦБГ I, ЭГ II и  $\beta$ -глюкозидазу *A.niger*, обладал высокими авицеллазной, КМЦазной и  $\beta$ -глюкозидазной (целлюбиазной) активностями.

**Гидролитическая способность ФП.** Оценка гидролитической способности ФП по отношению к различным видам целлюлозосодержащих материалов проводили по выходу ВС и глюкозы через 24 ч после начала гидролиза (при загрузке препаратов 5 мг белка на 1 г субстрата). Результаты гидролиза МКЦ представлены на рис. 3.

Препараты PV-FUS-1 и PV-FUS-2 показали относительно низкую гидролитическую способность — выходы глюкозы при гидролизе МКЦ были ниже контроля на 23 и 31 % соответственно (в качестве



**Рис. 3.** Выход продуктов гидролиза (глюкозы и ВС) МКЦ под действием препаратов на основе штаммов, несущих фьюжн-конструкцию, и штамма-реципиента (PV-151). Условия гидролиза: 5 мг белка на 1 г субстрата, 24 ч

контроля использовали выход глюкозы, полученный при гидролизе МКЦ ФП из исходного штамма *P. verruculosum* PV-151).

Более высокую гидролитическую способность по отношению к МКЦ показал ФП, содержащий в своем составе ЦБГ I, ЭГ II и  $\beta$ -глюкозидазу (PV-FUS-3). Выход глюкозы при гидролизе МКЦ данным препаратом был на 9 % выше, чем при гидролизе контрольным ФП PV-151.

Известно, что для осуществления эффективного биокаталитического процесса гидролиза целлюлозы необходимо наличие в составе ферментного комплекса эндоглюканаза, целлобиогидролаза и  $\beta$ -глюкозидаз [2, 11]. С этой точки зрения легко объяснимо преимущество ФП PV-FUS-3, имеющего в своем составе все три перечисленных фермента, тогда как в PV-FUS-1 отсутствовали эндоглюканаза и  $\beta$ -глюкозидаза, а в PV-FUS-2 отсутствовала  $\beta$ -глюкозидаза.

Следует отметить, что целлюлазный комплекс, продуцируемый исходным штаммом *P. verruculosum* PV-151, содержит в своем составе помимо ЦБГ I, ЭГ II,  $\beta$ -глюкозидазы и другие ферменты целлюлазного комплекса (в том числе: ЦБГ II, гемицеллюлазы, минорные компоненты комплекса). Представлялось интересным определить эффективность биокаталитического процесса гидролиза целлюлозосодержащего сырья при совместном применении ФП PV-151 и PV-FUS-3. В данном случае ФП PV-FUS-3 можно рассматривать не как самостоятельный комплексный биокатализатор, а как добавку, усиливающую действие ФП PV-151, полученного на основе исходного штамма *P. verruculosum*.

Гидролиз МКЦ смесями ФП PV-151 и PV-FUS-3 проводили по приведенной выше методике, добавляя в реакционную среду эти ФП в различном соотношении, но в таком количестве, чтобы общее содержание белка в реакционной смеси было неизменным и составляло 5 мг на 1 г субстрата. Зависимость выхода продуктов гидролиза через 24 ч после начала реакции от содержания препарата PV-FUS-3 в смеси представлена на рис. 4.

Согласно полученным данным небольшая (10 %) добавка ФП PV-FUS-3 значительно увеличивает гидролитическую способность ФП PV-151 (на 69 % по сравнению с индивидуальным ФП PV-151, используемым в качестве контрольного; контрольный выход глюкозы соответствует значению на оси ординат при нулевом содержании препарата PV-FUS-3, см. рис. 4). Наибольшего эффекта удалось добиться при 20 %-ном содержании ФП PV-FUS-3. В этом

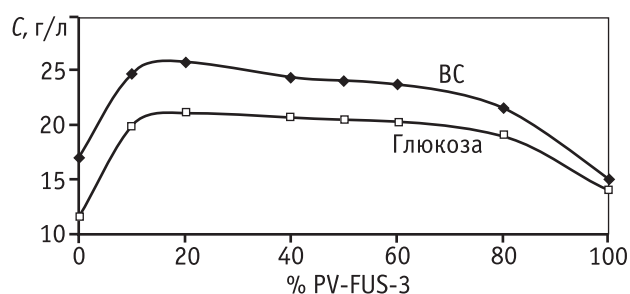


Рис. 4. Зависимость выхода продуктов гидролиза (ВС и глюкозы) МКЦ от содержания PV-FUS-3 в смеси препаратов PV-151 и PV-FUS-3

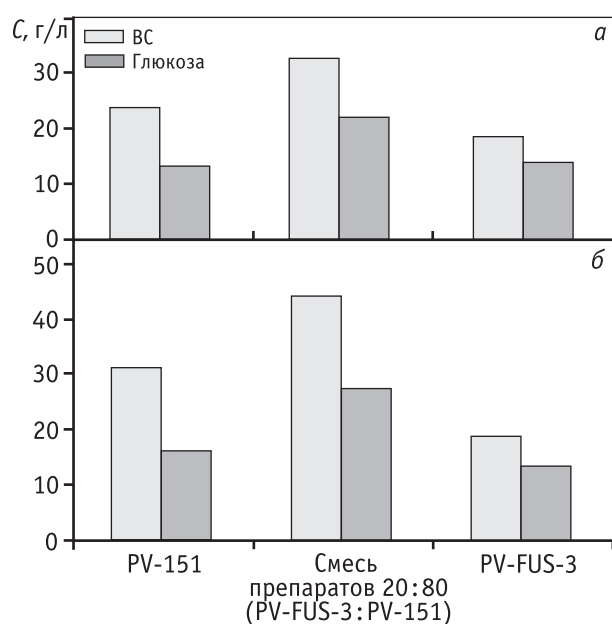
случае выход глюкозы при гидролизе смесью препаратов был на 81 % выше контрольного значения. Интересно отметить, что использование препарата PV-FUS-3 в качестве основного компонента бинарной смеси к подобному эффекту не приводило. Так, смесь, содержащая 80 % ФП PV-FUS-3 и 20 % PV-151, обеспечивала выход глюкозы на 62 % выше контрольного. Таким образом, в выбранных условиях эксперимента для смеси ФП оптимальным является соотношение 80 % PV-151 и 20 % PV-FUS-3.

Именно этот состав смеси, обеспечивающий наибольший эффект увеличения гидролитической способности по отношению к МКЦ, был использован при исследовании гидролитической способности смеси ФП PV-151 и PV-FUS-3 по отношению к природным субстратам — измельченной осиновой древесине и обессмоленной измельченной сосновой древесине. Гидролитические свойства смеси препаратов сравнивали с гидролитической способностью индивидуальных препаратов PV-151 и PV-FUS-3. Общее содержание белка в реакционной смеси во всех случаях было неизменным и составляло 5 мг на 1 г субстрата.

Согласно полученным данным (рис. 5) гидролитическая способность индивидуального ФП PV-FUS-3 по отношению к данным субстратам была такая же (в случае использования сосновой древесины) или ниже (в случае использования осиновой древесины), чем гидролитическая способность индивидуального ФП PV-151. Далее в качестве контрольных брали выходы глюкозы и ВС при гидролизе препаратом PV-151.

Эффективность биокаталитического процесса гидролиза выбранных субстратов смесью ФП повысилась по сравнению с индивидуальным препаратом PV-151, степень увеличения эффективности для сосновой и осиновой древесины была практически





**Рис. 5.** Выходы продуктов гидролиза измельченной обессмоленной сосновой древесины (а) и измельченной осиновой древесины (б) под действием ФП PV-FUS-3, PV-151 и их смеси (20 % PV-FUS-3, 80 % PV-151)

одинакова. При гидролизе обоих субстратов смесью ФП выход глюкозы был примерно на 70 % выше, чем при гидролизе контрольным препаратом PV-151, выход ВС при гидролизе сосновой и осиновой древесины смесью ФП был на 32 и 46 % соответственно выше контрольных значений.

Таким образом, можно утверждать, что ФП PV-FUS-3 может быть использован в качестве «усиливающей» добавки к целлюлазному ФП PV-151 для увеличения эффективности гидролиза целлюлозосодержащих субстратов. При добавлении 20 % препарата PV-FUS-3 к препарату PV-151 без изменения суммарной дозировки ФП в реакционной смеси рост эффективности гидролиза целлюлозосодержащих субстратов составляет до 70 %.

## Заключение

Данная работа ставила целью создание высокоэффективных биокатализаторов (целлюлазных ферментных препаратов) для конверсии растительной биомассы до сахаров, которые могут быть использованы далее для получения различных полезных продуктов. Для синтеза комплексных биокатализаторов с требуемыми свойствами был использован новый подход, заключающийся в применении фьюжн-конструкции для клонирования генов целе-

вых белков, позволяющий с высокой вероятностью получить рекомбинантные штаммы, секретирующие заданный набор ферментов. Результатом работы являются новые биокатализаторы на базе рекомбинантных штаммов гриба *P.verruculosum*. Особенность этих штаммов заключается в повышенной секреции одной или нескольких целевых высокоактивных целлюлаз — целлобиогидролазы I, эндоглюканазы II,  $\beta$ -глюкозидазы.

Рекомбинантный ферментный препарат *P.verruculosum* PV-FUS-3, полученный с помощью фьюжн-конструкции, имеющий в своем составе гомологичные целлобиогидролазу I, эндоглюканазу II и гетерологичную  $\beta$ -глюкозидазу *A.niger*, может быть использован в качестве добавки для увеличения гидролитической способности целлюлазного препарата *P.verruculosum* PV-151, полученного с помощью исходного штамма *P.verruculosum*. При использовании смеси препаратов PV-FUS-3 и PV-151 в соотношении 1 : 4 рост эффективности гидролиза целлюлозосодержащих материалов составляет до 70 % без изменения общего расхода биокатализатора.

*Данная работа была выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2012 годы» по государственному контракту 14.512.11.0071 от 19.04.2013.*

## Литература

1. Левин А.Б. Биоэнергетика — важнейшее средство повышения энергоэффективности лесного комплекса России // Лесной Вестник. 2012. Т. 8 (91). С. 160.
2. Jorgensen H., Kristensen J.B., Felby C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities // Biofuels, Bioproducts and Biorefining. 2007. Vol. 1. P. 119.
3. Sims R.E.H. Mabee W., Saddler J.N., Taylor M. An overview of second generation biofuel technologies // Biore-source Technology. 2010. Vol. 101. P. 1570.
4. Gincy M.M., Rajeev K.S., Reeta R.S., Ashok P. Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation // Journal of Scientific & Industrial Research. 2008. Vol. 67. P. 898.
5. Короткова О.Г., Семенова М.В., Морозова В.В., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Сеницын А.П. Выделение и свойства грибных  $\beta$ -глюкозидаз // Биохимия. 2009. Т. 75. № 5. С. 681.
6. Merino S.T., Cherry J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization // Advances in



- Biochemical Engineering// Biotechnology. 2007. Vol. 108. P. 95.
7. Margeot A., Hahn-Hagerdal B., Edlund M., Slade R., Monnot F. New improvements for lignocellulosic ethanol // Curr. Opin. in Biotechnol. 2009. Vol. 20 (3). P. 372.
  8. Kubicek C.P., Mikus M., Schuster A., Schmoll M., Seiboth B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina* // Biotechnology for Biofuels. 2009. Vol. 2. P. 19.
  9. Skomarovsky A.A., Gusakov A.V., Okunev O.N., Solov'eva I.V., Bubnova T.V., Kondrat'eva E.G., Synitsyn A.P. Studies of hydrolytic activity of enzyme preparation of *Penicillium* and *Trichoderma* fungi // Appl. Biochem. Microbiol. 2005. Vol. 41. P. 182.
  10. Martins L.F., Kolling D., Camassola M., Dillon A.J., Ramos L.P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates // Bioresource Technology. 2008. Vol. 99. P. 1417.
  11. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P. Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass // Biofuels. 2012. Vol. 3 (4). P. 463.
  12. Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V. Integrative and replicative transformation of *Penicillium canescens* with a heterologous nitrate-reductase gene // Current Genetics. 1995. Vol. 28. P. 474.
  13. Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы исследования и свойства целлюлолитических ферментов. М.: ВИНТИ, 1990. Т. 25. С. 154.
  14. Биссвангер Х. Практическая энзимология. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. С. 328.

УДК: 542.97

## КИНЕТИКА ПРОЦЕССА ГИДРОБЛАГОРАЖИВАНИЯ ТРИГЛИЦЕРИДОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ РАПСОВОГО МАСЛА В МЯГКИХ УСЛОВИЯХ

© 2013 г. С.А. Селищева<sup>1</sup>,  
М.Ю. Лебедев<sup>1</sup>,  
С.И. Решетников<sup>1</sup>,  
Л.И. Трусов<sup>2</sup>, В.А. Яковлев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Ассоциация делового сотрудничества в области передовых комплексных технологий ООО «АСПЕКТ»

### Введение

Липиды растительного происхождения, входящие в состав растительных масел, животных жиров, микроводорослей, в последнее время находят применение не только в пищевом секторе, но и в качестве сырья для получения биотоплива и полезных химических веществ.

Получение метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК), получивших название «биодизель», из триглицеридов жирных кислот известно с 1950 г. Самым распространенным способом является переэтерификация растительного, например рапсового, масла метанолом [1]. В качестве катализаторов переэтерификации до последнего времени использова-

ли гомогенные основания, в частности NaOH или КОН [2, 3], либо кислоты ( $H_2SO_4$ , HCl,  $H_3PO_4$ ) [4, 5], осуществляя процесс в мягких условиях (50–80 °С). Помимо широко используемого в Европе рапсового масла сырьем для получения биодизеля служат соевое, подсолнечное, пальмовое масла, масло ятрофы, а также отработанные в пищевом секторе масла и жиры и отходы масложировой промышленности [6–8].

Получение биодизеля с применением гомогенных катализаторов имеет ряд недостатков, связанных с тем, что полученную смесь необходимо разделять, нейтрализовать, тщательно промывать и