

- кая Т.Н., Брянская А.В., Будаева В.В., Железнов А.В., Железнова Н.Б., Золотухин В.Н., Митрофанов Р.Ю., Розанов А.С., Сорокина К.Н., Слынько Н.М., Яковлев В.А., Пельтек С.Е. Поиск возобновляемых источников целлюлозы для многоцелевого использования // Вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 3. С. 569—578.
13. Цуканов С.Н., Будаева В.В. Гидротермобарический способ получения целлюлозы из отходов злаков // Ползуновский вестник. 2011. № 4-1. С. 236—239.
 14. Цуканов С.Н., Будаева В.В. Предобработка мискантуса китайского в условиях гидротермобарического взрыва в нейтральной среде // Ползуновский вестник. 2010. № 4—1. С. 209—214.
 15. Пат. 2472808 Россия, С 1. Способ получения целлюлозы (варианты) и устройство для его осуществления / Будаева В.В., Цуканов С.Н., Сакович Г.В. № 2011134207/05, заявлено 15.08.2011; опубл. 20.01.2013, Бюл. № 2. 10 с.
 16. Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. М.: Экология, 1991. 320 с.
 17. ГОСТ 10820—75. Целлюлоза. Метод определения массовой доли пентозанов. Издание официальное. — М.: Изд-во стандартов, 1991. 8 с.
 18. ГОСТ 25438—82. Целлюлоза для химической переработки. Методы определения характеристической вязкости. Издание официальное. — М.: Издательство стандартов, 1982. 20 с.
 19. Макарова Е.И. Результаты ферментации целлюлозы мискантуса в ацетатном буфере и водной среде // Химия в интересах устойчивого развития. 2013. № 2. С. 219—225.

УДК 602.3 : 633/635

ЭНДОГЛЮКАНАЗА IV *TRICHODERMA REESEI* – НОВЫЙ КОМПОНЕНТ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ЦЕЛЛЮЛАЗНОГО КОМПЛЕКСА ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* ДЛЯ ГИДРОЛИЗА ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕЙ БИОМАССЫ

© 2013 г. О.В. Проскурина¹,
О.Г. Короткова²,
А.М. Рожкова², В.Ю. Матыс³,
А.В. Кошелев³, О.Н. Окунев³,
В.А. Немашкалов³,
О.А. Сеницына¹, В.В. Ревин⁴,
А.П. Сеницын^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН», г. Москва

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН», г. Пущино

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», г. Саранск

Введение

Одним из актуальных направлений развития биотехнологии на сегодняшний день является использование непищевой растительной биомассы в

качестве сырья для получения различных полезных продуктов. Входящие в состав растительной биомассы полисахариды (целлюлоза и гемицеллюлозы)

являются основой для биокаталитического превращения в глюкозу, другие гексозы, а также пентозы — это сахара, которые с помощью каталитических и биокаталитических методов могут быть превращены далее в различные спирты, органические и аминокислоты, полимеры, кормовые продукты [1–3]. К растительному сырью относятся отходы сельского хозяйства (различные виды соломы, кукурузные стебли), пищевой промышленности (багасса сахарного тростника, свекловичный жом), деревообрабатывающей промышленности (ветки, опилки). Такое сырье имеет ряд преимуществ: оно доступно, возобновляемо, широко распространено, экологически чистое. Использование непищевой растительной биомассы в качестве сырья для получения сахаров не затрагивает ценные ресурсы пищевой промышленности: зерно, пищевой сахар, крахмал, — которые применяются в настоящее время в качестве источника получения сахаров [4, 5].

Для биокаталитической конверсии полисахаридов клеточной стенки растений требуется ферментный комплекс карбогидраз, позволяющий эффективно разрушить полисахаридную матрицу, состоящую из целлюлозных и гемицеллюлозных микрофибрилл и других биополимеров [6]. Гемицеллюлозные компоненты растительной биомассы гидролизуются под действием ксиланаз, маннаназ, галактозидаз и других ферментов. Для эффектив-

ного гидролиза целлюлозы требуются ферменты трех типов: эндоглюканызы, целлобиогидролазы, β -глюкозидазы. Эндоглюканызы расщепляют целлюлозную цепь в произвольных позициях, снижая степень ее полимеризации и способствуя образованию свободных концевых групп; целлобиогидролазы отщепляют димеры целлобиозы от образовавшихся концевых групп; в свою очередь, целлобиоза расщепляется на мономеры под действием β -глюкозидазы. Эффективность функционирования мультиферментного биокаталитического комплекса (ферментного препарата) помимо других факторов зависит от активности индивидуальных компонентов и от сбалансированности состава ферментного комплекса [7, 8].

Помимо перечисленных выше гидролитических ферментов (карбогидраз) в ферментный комплекс для конверсии целлюлозы могут также входить оксидоредуктазы — негидролитические ферменты окислительно-восстановительной природы, секретируемые микроскопическими грибами совместно с гидролитическими ферментами. Хорошо изученными ферментами такого типа являются глюкозооксидазы и целлобиозодегидрогеназы, наличие этих ферментов в мультиферментном комплексе повышает эффективность биокаталитической конверсии целлюлозосодержащей биомассы [9, 10].

В последние годы в литературе освещается влияние ферментов-оксидоредуктаз нового типа — медь-зависимых полисахаридмонооксигеназ — на гидролитическую способность карбогидразного комплекса. Эти ферменты по аминокислотной последовательности и структурным особенностям относят к гликозил-гидролазам 61-й семьи (GH61). Согласно литературным данным, наличие небольших количеств ферментов такого типа в карбогидразном комплексе способно значительно повысить степень конверсии целлюлозосодержащего сырья [11].

Ферменты GH61 расщепляют целлюлозную цепь в произвольной позиции и таким образом разрушают кристаллические участки целлюлозы и формируют свободные концевые группы — точки связывания для целлобиогидролаз. По механизму окислительного действия ферменты GH61 делятся на два типа. Полисахаридмонооксигеназы первого типа окисляют произвольное звено целлюлозной цепи по C1-атому. При окислительном расщеплении целлюлозы монооксигеназами этого типа образуется невозстанавливающий конец целлюлозной цепи и окисленный восстанавливающий конец в

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

Короткова О.Г. — канд. хим. наук, мл. 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: amrojkova@yahoo.com

Матыс В.Ю. — мл. науч. сотр. Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН. Тел.: (496) 731-85-55. E-mail: solve@rambler.ru

Кошелев А.В. — науч. сотр. того же института. Тел. тот же. E-mail: koshelyan@rambler.ru

Окунев О.Н. — канд. биолог. наук, зав. сектором того же института. Тел. тот же. E-mail: oleg_nokunev@rambler.ru

Немашкалов В.А. — канд. биолог. наук того же института. Тел. тот же. 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: oasinityna@gmail.com

Ревин В.В. — д-р биолог. наук, декан, зав. кафедрой, проф. Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева. Тел.: (834) 32-45-54. E-mail: revinvv2010@yandex.ru

Синицын А.П. — д-р хим. наук, зав. лабораторией химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Тел.: (495) 939-59-66. E-mail: apsinityn@gmail.com

лактоновой форме. Монооксигеназы второго типа атакуют глюкопиранозное кольцо по С4-атому. Продуктами действия ферментов этого типа являются восстанавливающий конец целлюлозной цепи и окисленный невосстанавливающий конец в 4-кетотальдозной форме [12, 13]. Согласно результатам исследования [13] для окисления целлюлозы под действием медьзависимых полисахаридмонооксигеназ требуется молекулярный кислород.

Очевидно, что использование ферментов GH61 как добавки к карбогидразному ферментному комплексу для усиления его гидролитической способности является важной задачей, имеющей практический интерес в области применения ферментных препаратов как биокатализаторов процесса гидролиза непищевой растительной биомассы.

Одним из наиболее изученных ферментов GH61 является эндоглюканаза IV (ЭГИV) из гриба *Trichoderma reesei*. Следует отметить, что ферменты GH61 структурно схожи с эндоглюканазами, поэтому до недавнего времени они считались малоактивными эндоглюканазами [14]. Однако, как отмечалось выше, ферменты GH61 являются монооксигеназами, и устоявшееся название ЭГИV *T.reesei* не имеет отношения к механизму действия данного фермента.

Штамм мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* является перспективным продуцентом гидролитического комплекса ферментов-карбогидраз, поскольку секретирует высокоактивный целлюлазный комплекс [15, 16]. Поэтому использование гриба *P. verruculosum* как базового штамма для создания эффективных ферментных препаратов, в которых кроме целлюлолитических ферментов будут присутствовать усиливающие их действие при биоконверсии непищевой растительной биомассы монооксигеназы GH61, является актуальной задачей.

Нами на основе штамма-реципиента *P. verruculosum* 537 был создан рекомбинантный штамм, несущий ген GH61 *egl4*, выделенный из *T. reesei* и кодирующий эндоглюканазу IV (ЭГИV). Биосинтез ЭГИV регулировался индуцибельным промотором гена целлюбогидролазы I (*cbhI*) *P. verruculosum*. На основе нового рекомбинантного штамма был получен новый ферментный препарат, содержащий целлюлазный комплекс реципиентного штамма *P. verruculosum* и гетерологичный фермент GH61 *T. reesei*.

Целью данной работы являются анализ свойств нового ферментного препарата, содержащего гетерологичный фермент GH61, изучение его гидролитической способности по отношению к целлюлозосо-

держающим субстратам и определение компонентного состава этого ферментного препарата.

Материалы и методы исследования

Ферментные препараты. Исследуемые ферментные препараты были получены при лиофильном высушивании ультрафильтрованных культуральных жидкостей исходного штамма *P. verruculosum* (PV-151) и рекомбинантного штамма с гетерологичной экспрессией эндоглюканазы IV (PV-ЭГИV). Ферментные препараты были получены в ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН.

Определение биохимических характеристик ферментных препаратов. Для определения масс белков в препаратах и последующего трипсинолиза для пептидного масс-фингерпринта проводили электрофорез белков в денатурирующих условиях. Электрофорез проводили на 12 %-ном ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия 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).

Масс-спектрометрический анализ трипсиновых гидролизатов белков. Для идентификации гетерологичного белка (ЭГИV *T. reesei*) использовали масс-спектрометрический анализ трипсинового гидролизата. Вырезали из геля после электрофореза фрагменты, молекулярная масса которых соответствовала искомому белку. Фрагменты геля отмывали от красителя и других веществ водно-органическим раствором бикарбоната аммония, сушили ацетонитрилом. Далее их обрабатывали трипсином (50 мМ NH_4HCO_3 , трипсин модифицированный свиной 5 мкг/мл, Promega, США) для гидролиза белков, содержащихся в ячейках геля. Полученные пептиды экстрагировали из фрагментов геля и получали MALDI-TOF масс-спектры на системе AUTOFLEX II (Bruker Daltonics, Германия) в лаборатории масс-спектрометрии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Анализ полученных масс-спектров осуществляли с помощью программы MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) в базе данных NCBI или SwissProt.

Определение ферментативных активностей [17]. Гидролитические активности препаратов и фракций после хроматографии определяли по отношению к п-нитрофенил- β -D-глюкопиранозиду (ПНФГ) и

к ряду полисахаридных субстратов — микрокристаллической целлюлозе (авицелу, МКЦ), натривой соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), глюкуронооксиану березы. Активности по указанным субстратам характеризуют целевые активности основных компонентов карбогидразных препаратов: активность по ПНФГ характерна для β -глюкозидаз, для целлобиогидролаз характерна активность по МКЦ, для эндоглюканаз — активность по КМЦ, ксиланазы характеризуются активностью по глюкуронооксиану.

Активность по отношению к ПНФГ определяли по начальной скорости образования окрашенного продукта — п-нитрофенола, концентрацию п-нитрофенола определяли спектрофотометрически по изменению поглощения на длине волны 400 нм. Реакцию проводили при температуре 40 °С, pH = 5,0 (0,1 М Na-Ас буфер), концентрация субстрата составляла 0,05 М, время реакции — 10 мин. Реакцию останавливали добавлением раствора 1М Na₂CO₃.

Гидролитическую активность по отношению к полисахаридным субстратам определяли по начальной скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС). Концентрацию ВС определяли методом Шомоди — Нельсона. Реакции проводили в следующих условиях: 50 °С, pH = 5,0, концентрация полисахаридного субстрата в реакционной смеси — 5 г/л. Для определения активности по МКЦ — нерастворимому субстрату — реакционную смесь в течение эксперимента перемешивали.

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, в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (БСА).

Целлюлозосодержащие субстраты. В качестве субстратов для определения гидролитической способности были использованы измельченная осиновая древесина (измельчение проводили в ОАО «ГосНИИсинтезбелок» на планетарной мельнице-активаторе типа АГО-2С, размер частиц после помола составлял 5—10 мкм) и МКЦ (МС-112, «Витэк Групп»).

Проведение гидролиза растительных субстратов. Эксперимент проводили в пробирках с закручивающейся крышкой при термостатировании и перемешивании в термошейкере BIOSAN TS-100 (Латвия). Температура реакционной смеси составила

50 °С, частота вращения мешалки — 1000 об./мин. Концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 100 г/л (в пересчете на сухое вещество), реакцию проводили в 0,1 М Na-ацетатном буфере pH = 5,0. Ферментный препарат в реакционную смесь добавляли в пересчете на белок (2 мг белка на 1 г сухого вещества субстрата). Конечный объем реакционной смеси составил 1,5 мл. В качестве контроля проводился опыт, где вместо раствора ферментных препаратов в реакционную смесь добавляли соответствующее количество буферного раствора.

Эксперимент проводили в течение двух суток. Через определенные промежутки времени (3, 12 и 24 ч) из реакционной смеси отбирали пробы и измеряли в них концентрацию ВС (методом Шомоди — Нельсона [18]) и глюкозы (глюкозооксидазнопероксидазным методом [18]).

Анализ состава ферментных препаратов. Компонентный состав ферментных препаратов исследовали методом анионообменной FPLC. Сухую навеску препарата растворяли в Na-Ас буфере (pH = 5,0), центрифугировали, обессоливали методом гельпроникающей хроматографии на носителе BioGel P-6 и переводили в стартовый для анионообменной хроматографии буфер (20мМbis-Tris/HCl, pH = 6,9).

Для фракционирования использовали хроматографическую систему FPLC, колонки и носители фирмы Pharmacia (Швеция). Хроматографию проводили на колонке с носителем Source 15Q. Образец наносили в стартовом буфере Bis-Tris/HCl при pH 6,9; связавшиеся белки элюировали градиентом концентрации NaCl. В полученных в ходе элюирования фракциях определяли авицелазную, КМЦазную, ксиланазную и β -глюкозидазную активности, а также содержание белка.

Результаты и их обсуждение

Получение и биохимические свойства ферментных препаратов. Методами генетической инженерии и микробиологии в исходный штамм-продуцент *P.verruculosum* 537 была трансформирована экспрессионная плазмида pPrCBH-EGIV (рис. 1), несущая ген *egl4*, кодирующий ЭГИV *T.reesei* (предполагаемая молекулярная масса ЭГИV составила 35,5 кДа). В результате скрининга был отобран штамм *P.verruculosum* PV-ЭГИV, продуцирующий наряду с ферментами карбогидразного комплекса *P.verruculosum* значительное количество рекомбинантного фермента EGIV. Выбранный трансформант

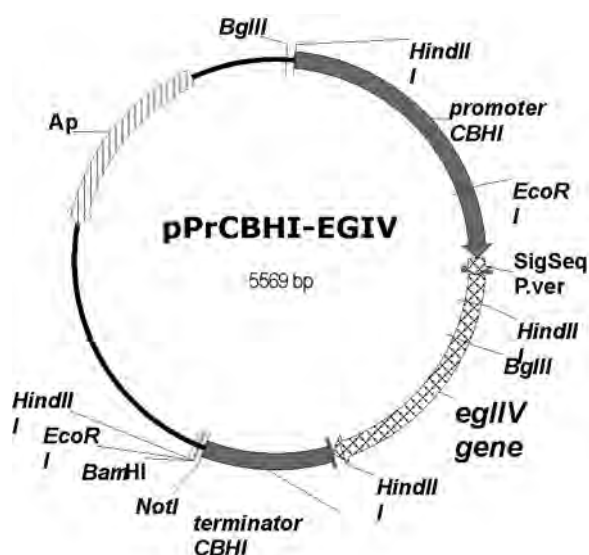


Рис. 1. Схематическое представление плазмиды pPrCBHI-EGIV, несущей ген *eglIV* гетерологичной эндоглюканазы IV из *Trichoderma reesei*

был использован нами для дальнейшей наработки сухого ферментного препарата после ферментации в 1-литровых ферментерах.

В качестве контроля был использован сухой ферментный препарат, полученный с помощью исходного штамма *P. verruculosum* PV-151.

Электрофореграммы препаратов представлены на рис. 2. Электрофореграмма препарата PV-ЭГIV отличается от электрофореграммы препарата PV-151 увеличенной интенсивностью полосы, соответствующей массе белка около 40 кДа. Коммерческие препараты Celluclast 1.5L и Spezyme CP и препарат на основе исходного штамма *P. verruculosum* (PV-151) имеют интенсивные полосы в области 65—50 кДа, что соответствует массам целлобиогидролаз грибов родов *Penicillium* и *Trichoderma*. ФП PV-ЭГIV характеризуется интенсивной полосой ЭГIV (35 кДа). Для идентификации гетерологичного белка из ДДС-электрофореза вырезали образец геля, соответствующий белку искомой массы. Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии трипсинового гидролизата белка с дальнейшим поиском в базах данных белков NCBI, MSDB и SWISS-PROT, дающих при трипсинолизе пептиды с идентичными молекулярными массами, вырезанный белок был определен как ЭГIV *T. reesei*, принадлежащая 61-й семье гликозил-гидролаз.

Удельные активности ферментных препаратов по специфическим субстратам приведены в табл. 1. Из представленных данных следует, что целевые активности нового препарата PV-ЭГIV ниже, чем у

Таблица 1

Содержание белка и активность сухих ферментных препаратов (ФП)

ФП	Содержание белка, мг/г	Активность ФП, ед./мг белка			
		КМЦаза	Авицеллаза	Ксиланаза	ПНФГ
PV-ЭГIV	519	7,9	0,2	17,1	3,25
PV-151	840	13,7	1,3	29,5	0,99
Spezyme CP	153	21,4	1,6	5,8	0,44
Celluclast 1.5L	180	17	1,3	2,9	0,10

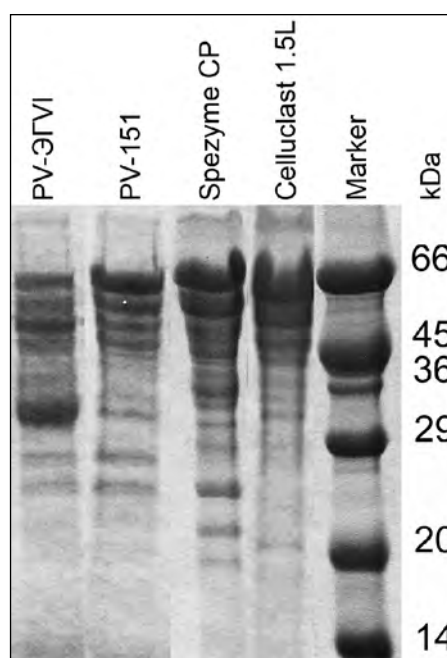


Рис. 2. Электрофореграммы коммерческих ФП и лабораторных ФП на основе рекомбинантного и исходного штамма *P. verruculosum*

контрольного препарата PV-151 на основе исходного штамма. Этот факт можно объяснить уменьшением количества собственных гидролаз (карбогидраз) в препарате за счет появления значительного количества гетерологичного фермента (оксидазы), не обладающего гидролитической активностью.

Гидролитическая (осахаривающая) способность ферментных препаратов. Проведено сравнение гидролитической способности по отношению к целлюлозосодержащим субстратам нового ферментного препарата PV-ЭГIV, контрольного препарата PV-151 на основе исходного штамма *P. verruculosum* и коммерческих (промышленных) целлюлазных препаратов, полученных с помощью грибных продуцентов рода

Trichoderma — Spezyme CP (Novozymes, Дания) и Celluclast 1.5L (Genencor/Danisco, США).

В качестве целлюлозосодержащих субстратов использовали измельченную осиную древесину и МКЦ. МКЦ — нерастворимое, устойчивое к гидролизу, в том числе к ферментативному гидролизу, вещество. Кристаллическая целлюлоза является основным фрагментом лигноцеллюлозной биомассы. Осина — быстрорастущее растение, один из важнейших промышленных источников целлюлозосодержащей биомассы для России. За критерий гидролитической способности ферментных препаратов по отношению к выбранным субстратам принимали выходы глюкозы и ВС после 24 ч гидролиза. На рис. 3 представлены выходы продуктов гидролиза. Дозировка ферментных препаратов составляла 2 мг белка на 1 г субстрата.

Из рис. 3 видно, что препараты, полученные с помощью штаммов гриба *P. verruculosum* (PV-ЭГIV и PV-151), обладают более высокой гидролитической способностью по отношению к целлюлозосодержащим субстратам, чем промышленные препараты.

Из сравнения выходов целевого продукта гидролиза (глюкозы) при гидролизе МКЦ новым рекомбинантным препаратом PV-ЭГIV и промышленными препаратами следует, что препарат PV-ЭГIV

обеспечивает увеличение выхода глюкозы на 45 % больше, чем Celluclast 1.5L, и на 25 % больше, чем Spezyme CP. Контрольный препарат PV-151 при гидролизе МКЦ был на 30 и 5 % эффективнее, чем препараты Celluclast 1.5L и Spezyme CP соответственно. Гидролитическая способность нового рекомбинантного препарата PV-ЭГIV по отношению к МКЦ была на 20 % выше, чем гидролитическая способность препарата на основе исходного штамма PV-151.

Препарат PV-ЭГIV приводил к увеличению выхода глюкозы в случае гидролиза измельченной осиневой древесины на 43 и 17 % по сравнению с препаратами Celluclast 1.5L и Spezyme CP соответственно, а препарат PV-151 гидролизировал измельченную осиневую древесину на 35 % эффективнее, чем препарат Celluclast 1.5L, и на 9 % эффективнее, чем препарат Spezyme CP. Гидролитическая способность нового ферментного препарата PV-ЭГIV по отношению к измельченной осиневой древесине была на 10 % выше гидролитической способности контрольного препарата PV-151.

Компонентный состав ферментных препаратов.

Для определения компонентного состава мультиферментного препарата PV-ЭГIV мы предложили метод анионообменного FPLC-фракционирования, позволяющий отделить гетерологичный белок ЭГIV *T. reesei* от других ферментов. Особенность метода заключалась в плавном изменении концентрации NaCl в элюенте на первой фазе фракционирования. Такой подход позволил разделить целлобиогидролазы I и II типов, а также ЭГIV. Во фракциях после хроматографии определяли гидролитические активности по ряду субстратов и проводили ДДС-электрофорез для определения масс белков, содержащихся во фракциях. Исходя из объема фракций, концентрации белка в них, данных ДДС-электрофореза, сопоставления активности во фракциях по отношению к различным субстратам (МКЦ, КМЦ, ПНФГ, ксилан) с удельными активностями соответствующих ферментов, определяли содержание различных индивидуальных ферментов в препарате. Состав исследуемых ферментных препаратов представлен в табл. 2.

Согласно полученным данным содержание ЭГIV *T. reesei* в рекомбинантном препарате PV-ЭГIV составляет 24 % от общего пула ферментов препарата. Содержание гидролаз, в частности целлобиогидролаз I и II — основных ферментов, разрушающих целлюлозу [7] в препарате PV-ЭГIV, заметно снижено по сравнению с контрольным препаратом

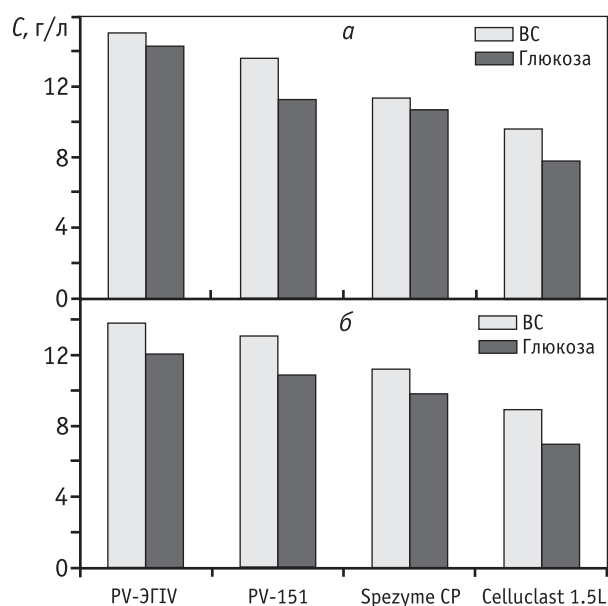


Рис. 3. Выходы продуктов гидролиза (глюкозы и ВС) МКЦ (а) и измельченной осиневой древесины (б) под действием коммерческих препаратов Celluclast 1.5L и Spezyme CP и препаратов на основе штамма-реципиента *P. verruculosum* (PV-151) и штамма *P. verruculosum*, несущего ген ЭГIV *T. reesei* (PV-ЭГIV)

Таблица 2

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

Ферменты	ФП, мас.%			
	PV-ЭГIV	PV-151	Spezyme CP	Celluclast 1.5L
Целлобиогидролазы	40	69	51	65
Эндоглюканазы	11	16	22	17
Ксиланазы	3	3	7	5
β -глюкозидазы	5	4	< 1	< 1
ЭГIV	24	—	—	—
Другие белки	18	8	20	12

PV-151, полученным на основе исходного штамма *P. verruculosum* (содержание целлобиогидролаз I и II в препаратах PV-ЭГIV и PV-151 составляет 69 и 40 % соответственно). При анализе компонентного состава промышленных препаратов можно отметить, что количество целлобиогидролаз составляет более 50 % от всех ферментов комплекса.

Данные, полученные при изучении компонентного состава препаратов PV-ЭГIV и PV-151, коррелируют с их удельной авицелазной активностью, характеризующей активность целлобиогидролаз: препарат PV-ЭГIV обладал более низкой авицелазной активностью, чем PV-151 (см. табл. 1, отметим, что авицелазную активность определяли по начальным скоростям гидролиза МКЦ, в течение 1 ч гидролиза). На первый взгляд, от препарата PV-ЭГIV, имеющего пониженную удельную авицелазную активность и уменьшенное содержание ключевых гидролитических ферментов (целлобиогидролаз) по сравнению с другими использованными нами ферментными препаратами, следовало ожидать пониженной гидролитической способности по отношению к целлюлозосодержащим субстратам при их длительном гидролизе (24 ч). Однако результаты длительного гидролиза МКЦ и измельченной осиновой древесины показали значительное преобладание гидролитической способности рекомбинантного ферментного препарата PV-ЭГIV по сравнению с таковой для контрольного препарата PV-151 и промышленных ферментных препаратов. Можно с большой вероятностью утверждать, что такой эффект обусловлен влиянием наличия белка GH61 ЭГIV *T. reesei* в составе рекомбинантного ферментного препарата PV-ЭГIV.

Таким образом, высокая эффективность действия препарата PV-ЭГIV, проявляемая несмотря на пониженное содержание гидролитических ферментов, обусловлена влиянием окислительного фермента нового типа — ЭГIV *T. reesei*. Ферментные комплексы, имеющие в своем составе ферменты GH61, могут стать основой для получения высокоэффективных ферментных препаратов нового поколения, предназначенных для биоконверсии возобновляемого растительного сырья.

Заключение

Целью данной работы было создание высокоэффективных биокатализаторов нового поколения на основе штамма *P. verruculosum*. В отличие от ставших классическими ферментных препаратов, эффективность которых зависит только от свойств входящих в их состав гидролаз, повышенная гидролитическая способность препаратов нового поколения обусловлена также наличием оксигеназ, относящихся к семейству белков GH61.

Нами получен и исследован ферментный препарат на основе рекомбинантного штамма *P. verruculosum*, несущего ген белка, относящегося к 61-й семье гликозил-гидролаз — ЭГIV *T. reesei*. Экспрессия гетерологичной ЭГIV доказана электрофоретическим и масс-спектрометрическим методами. Показано, что новый рекомбинантный ферментный препарат обладает повышенной гидролитической (осахаривающей) способностью по отношению к целлюлозосодержащим субстратам (МКЦ и измельченной осиновой древесине) при их длительном гидролизе по сравнению с контрольным препаратом, полученным с помощью исходного штамма *P. verruculosum*. Исходя из содержания индивидуальных ферментов, входящих в новый рекомбинантный ферментный препарат PV-ЭГIV, а также в контрольный препарат PV-151, можно с большой вероятностью утверждать, что такой эффект обусловлен наличием фермента GH61 ЭГIV *T. reesei* в составе рекомбинантного ферментного препарата.

В ходе исследования установлено, что препараты на основе штаммов гриба *P. verruculosum* значительно эффективнее гидролизуют целлюлозосодержащие субстраты, чем коммерческие препараты зарубежного производства (Celluclast 1.5L и Spezyme CP). Таким образом, препараты на основе штаммов *P. verruculosum* конкурентоспособны среди целлюлазных препаратов, и создание на их основе новых высокоэффек-

тивных биокатализаторов нового поколения является перспективным направлением исследований.

Биокаталитическая конверсия до простых сахаров и далее до других полезных продуктов является перспективным методом переработки растительной биомассы. Стоимость процесса переработки растительной биомассы зависит от стоимости и эффективности биокатализаторов, осуществляющих конверсию полисахаридов клеточной стенки. Создание отечественных биокатализаторов с высокой гидролитической способностью позволит снизить стоимость процесса ферментативной конверсии растительной биомассы и повысить рентабельность ее переработки. Проведенное исследование является важным шагом в создании биокатализаторов нового поколения для биоконверсии растительного сырья.

Данная работа выполнена при поддержке федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2013 годы» по государственному контракту № 14.512.11.0073 от 15.04.2013.

Литература

1. *Malherbe S., Cloete T.E.* Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications // *Biomass*. 2002. P. 105—114.
2. *Jorgensen H., Kristensen J.B., Felby C.* Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities // *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2007. № 1. С. 119—134.
3. *Sims R.E.H., Mabee W., Saddler J.N., Taylor M.* An overview of second generation biofuel technologies // *Bioresource Technology*. 2010. № 101. С. 1570—1580.
4. *Kamm B., Kamm M.* Biorefinerie; multi product processes // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2007. № 105. P. 175—204.
5. *Galbe M., Sassner P., Wingren A. and Zacchi G.* Process engineering economics of bioethanol production // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2007. № 108. P. 303—327.
6. *Abramson M., Shoseyov O., Shani Z.* Plant cell wall reconstruction toward improved lignocellulosic production and processability // *Plant Science*. 2010. № 178. P. 61—72.
7. *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. № 67. С. 898—907.
8. *Banerjee G., Car S., Scott-Craig J.S., Borrusch M.S., Bongers M., Walton J.D.* Synthetic multi-component enzyme mixtures for deconstruction of lignocellulosic biomass // *Bioresource Technology*. 2010. № 101. P. 9097—9105.
9. *Sygmund C., Kracher D., Scheiblbrandner S., Zahma K., Felice A.K., Harreither W., Kittl R., Ludwig R.* Characterization of the two *Neurospora crassa* cellobiose dehydrogenases and their connection to oxidative cellulose degradation // *Applied and Environmental Microbiology*. 2012. № 78 (17). P. 6161—6171.
10. *Mansfield S.D., De Jong E., Saddler J.N.* Cellobiose dehydrogenase, an active agent in cellulose depolymerization // *Applied and Environmental Microbiology*. 1997. № 63 (10). P. 3804—3809.
11. *Harris P.V., Welner D., McFarland, K.C., Re E., Poulsen J.C.N., Brown K., Salbo R., Ding H., Vlasenko E., Merino S., Xu F., Cherry J., Larsen S., Leggio L.L.* Stimulation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis by Proteins of Glycoside Hydrolase Family 61: Structure and Function of a Large, Enigmatic Family // *Biochemistry*. 2010. № 49. P. 3305—3316.
12. *Quinlana R.J., Sweeney M.D., Leggio L.L., Otten H., Poulsen J.C.N., Johansen K.S., Krogh K.B.R.M., Jorgensen C. I., Tovborg M., Anthonsen A., Tryfona T., Walter C.P., Dupree P., Xu F., Davies G.J. and Walton P.H.* Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components // *PNAS*. 2011. Vol. 108 № 37. P. 15079—15084.
13. *Beeson W.T., Phillips C.M., Cate J.H.D., Marletta M.A.* Oxidative Cleavage of Cellulose by Fungal Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenases // *Journal of American Chemical Society*. 2012. № 134. P. 890—892.
14. *Saloheimo M., Nakari-Setälä T., Tenkanen M., Penttilä M.* cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast // *European Journal of Biochemistry*. 1997. № 249. P. 584—591.
15. *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 // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2005. № 41. С. 182—184.
16. *Martins L.F., Kolling D., Camassola M., Dillon A.J., Ramos L.P.* Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates // *Bioresource Technology*. 2008. № 99. С. 1417—1424.
17. *Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В.* Методы исследования и свойства целлюлолитических ферментов. М.: ВИНТИ, 1990. Т. 25. 154 с.
18. *Биссвангер Х.* Практическая энзимология. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. 328 с.