

4. Бокин А.И., Балаев А.В., Баженов М., Касьянова Л.З., Кутепов Б.И. Моделирование процесса дегидрирования изоамиленов в адиабатическом реакторе с неподвижным слоем катализатора // Катализ в промышленности. 2004. № 6. С. 25.
5. Боресков Г.К. Гетерогенный катализ. М.: Наука, 1986.
6. Краснов К.С., Воробьев Н.К., Годнев И.Н. и др. Физическая химия. М.: Высш. шк., 2001.
7. Павлов К.Ф., Романков П.Г., Носков А.А. Примеры и задачи по курсу процессов и аппаратов химической технологии. Л.: Химия, 1987.
8. Лебедев Н.Н. Теория химических процессов основного органического и нефтехимического синтеза. М.: Химия, 1984.
9. Жоров Ю.М. Термодинамика химических процессов. М.: Химия, 1985.
10. NIST Chemistry WebBook (NIST Standard Reference Database: База данных национального института стандартов и технологий США) [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
11. Ламберов А.А., Дементьева Е.В., Гильманов Х.Х. и др. Промышленные испытания отечественного и зарубежных катализаторов дегидрирования изоамиленов в изопрен // Катализ в промышленности. 2008. № 4. С. 29.

УДК 577.15, 663.15

ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ РЕКОМБИНАНТНОГО ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* И ПРИМЕНЕНИЕ ИХ В ГИДРОЛИЗЕ ОТХОДОВ ДЕРЕВООБРАБАТЫВАЮЩЕЙ И СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

© 2011 г. О.Г. Короткова¹,
А.М. Рожкова¹, В.Ю. Матыс²,
А.В. Кошелев², О.Н. Окунев²,
В.А. Немашкалов², О.А. Сеницына³,
А.Г. Правильников¹,
Р.М. Андрианов¹,
И.Н. Овешников⁴, Е.Р. Давидов⁴,
А.П. Сеницын^{1,3}

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова⁴ ОАО «ГосНИИСинтезбелок», Москва

Введение

Увеличение потребления энергии, истощение запасов ископаемого топлива, а также проблемы, связанные с глобальным потеплением климата и загрязнением окружающей среды привели к необходимости поиска альтернативных источников сырья [1]. Наиболее перспективным источником сырья для

получения простых сахаров и, затем, биобутанола, а также продуктов микробиологического синтеза в России является целлюлозосодержащее сырье и его отходы: быстрорастущие многолетние растения (например, тополь, осина), лесосечные, целлюлозно-бумажной и лесо-химической промышленнос-

ти, различные сельскохозяйственные — солома злаковых, стебли и початки кукурузы, трава, камыш, а также твердые бытовые. В России ежегодно образуется 15 млрд т растительной биомассы, 800 млн т древесины, 50 млн т отходов переработки леса (в основном, неиспользуемых лесосечных), 250 млн т отходов сельского хозяйства, 50—60 млн т твердых муниципальных отходов.

Растительная биомасса и целлюлозосодержащие отходы состоят преимущественно из трех компонентов: целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина. Конверсия целлюлозы осуществляется гидролитическими ферментами целлюлазного комплекса, в состав которого входят эндо-деполимеразы (эндоглюканызы), экзо-деполимеразы (целлобиогидролазы), а также β -глюкозидаза (целлобиаза) [2]. Гемицеллюлозы, представленные, в основном, ксиланами, подвергаются конверсии ксиланолитическими ферментами (ксиланазами). Эффективность конверсии полисахаридов растительной биомассы во многом зависит от сбалансированности состава целлюлазного комплекса и активности ксиланаз. Действие ферментов на полисахариды растительной биомассы приводит к образованию моносахаридов: гексоз — преимущественно глюкозы, и пентоз — преимущественно ксилозы, которые могут быть превращены в спирты, органические кислоты,

аминокислоты и другие продукты микробиологического синтеза.

Ранее нами было показано, что мутантный штамм низшего гриба *Penicillium verruculosum* — мощный продуцент активного внеклеточного комплекса целлюлаз [2—8]. Его преимущество — высокая секреторная способность (40—50 г/л внеклеточного белка). В то же время он имеет относительно низкий уровень β -глюкозидазной и ксиланазной активности. Отметим, что β -глюкозидазы являются одними из ключевых ферментов целлюлазного комплекса, поскольку осуществляют гидролиз до глюкозы промежуточного продукта конверсии целлюлозы — целлобиозы, являющейся ингибитором эндоглюканызы и целлобиогидролазы. Таким образом, β -глюкозидазы способны не только производить глюкозу в качестве конечного продукта гидролиза, но и повышать общую эффективность деструкции целлюлозы. Низкий уровень ксиланазной активности не позволяет обеспечить высокую эффективность конверсии ксиланов, присутствующих в растительном сырье. Поэтому создание рекомбинантных штаммов *P. verruculosum*, продуцирующих целлюлазный комплекс с дополнительно увеличенной активностью β -глюкозидазы, а также ксиланазы является важной задачей на пути получения промышленных штаммов микроорганизмов — продуцентов ферментов, необходимых для высокоэффективной конверсии растительной биомассы.

Классическим способом получения штаммов-продуцентов целевых белков является создание генно-инженерных экспрессионных 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» фермента и в результате гомологичной рекомбинации происходит встраивание целевого гена в хромосому гриба. Такая система экспрессии дает значимое количество целевого белка, она стабильна и индуцибельна, однако приводит к общему снижению продуктивности штамма-реципиента [9].

В данной работе используется конститутивная неиндуцибельная система экспрессии под контролем гомологичного гистонового промотора H4.1, позволяющая получать меньшие (по сравнению с индуцибельной системой экспрессии) количества целевого белка [10], однако общий уровень секретируемых белков остается на уровне исходного штамма.

Короткова О.Г. — 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.: (495) 954-27-32, E-mail: amrojkova@yahoo.com.

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

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

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

Немашкалов В.А. — аспирант 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.

Правильников А.Г. — аспирант Института биохимии им. А.Н. Баха РАН. Тел.: (495) 954-27-32. E-mail: pravilnikov@mail.ru.

Андрюанов Р.М. — аспирант того же института. Тел.: (495) 954-27-32. E-mail: andrianovrm@mail.ru.

Овешников И.Н. — мл. науч. сотрудник ОАО «ГосНИИсинтезбелок». E-mail: belok@rutenia.ru.

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

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

Цель работы — анализ свойств новых ферментных препаратов, полученных с помощью рекомбинантных штаммов *P. verruculosum* с использованием гистоновой системы экспрессии, с увеличенной гетерологичной экспрессией β -глюкозидазы *Aspergillus niger* и эндо- β -1,4-ксилазы *P. canescens*, а также изучение осахаривающей способности этих препаратов при гидролизе растительного сырья разных видов — измельченной древесины, сосны и осины, а также багассы.

Материалы и методы исследования

Ферментные препараты. Были использованы сухие препараты ферментов, полученные в ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН (Пушино) лиофильным высушиванием культуральных жидкостей исходного штамма *P. verruculosum* (PV-151) и рекомбинантных штаммов с гетерологичными генами β -глюкозидазы *A. niger* (PV- β -Glu) и ксиланазы *P. canescens* Ксил-31 (PV-Xyl) [11–12], выращенных в ферментерах на среде с целлюлозой. Для сравнения выбрали один из лучших коммерческих целлюлазных препаратов Spezyme CP («Genencor», США), полученный из культуральной жидкости гриба — продуцента *Trichoderma reesei* и традиционно используемый в качестве «референсного» для оценки эффективности действия целлюлолитических ферментных препаратов.

Определение биохимических характеристик. Электрофорез белков в денатурирующих условиях (в присутствии додецилсульфата натрия) 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).

Масс-спектрометрический анализ трипсиновых гидролизатов белков. Для идентификации гетерологичных белков использовали масс-спектрометрический анализ их трипсиновых гидролизатов. Вырезали из ДДС-электрофореза фрагменты геля, соответствующие искомым белкам (β -глюкозидазе *A. niger* и ксиланазе *P. canescens*). Фрагменты геля отмывали от красителя и додецилсульфата натрия, подвергали гидролизу трипсином (50 мМ NH_4HCO_3 , трипсин — модифицированный свиной 5 мкг/мл, «Promega», США) [13]. Полученные пептиды экстрагировали из фрагментов геля 0,1 %-ной трифторуксусной кислотой и 20 %-ным ацетонитрилом и

затем получали MALDI-TOF масс-спектры на системе AUTOFLEX II («Bruker Daltonics», Германия) в лаборатории масс-спектрометрии химического факультета МГУ. Результаты масс-спектрометрии анализировали, используя программу MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) в базе данных NCBI или SwissProt.

Определение ферментативных активностей. Активность по отношению: к микрокристаллической целлюлозе (авицелу, МКЦ), характеризующую целлюбогидролазную активность; к Na-соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), характеризующую активность эндоглюканаз; к глюкуроноксилану березы, характеризующую ксиланазную активность, определяли при 50 °С и pH = 5,0 по начальной скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС), концентрацию которых определяли методом Шомоди–Нельсона [14]. Концентрация полисахаридного субстрата в реакционной смеси составляла 5 г/л.

β -Глюкозидазную активность определяли по начальной скорости образования п-нитрофенола (ПНФ) из п-нитрофенил- β -D-глюкопиранозида (ПНФГ), используя методику [15]. Раствор 0,05 М субстрата в 0,1 М, Na-ацетатном буфере, pH = 5,0, инкубировали с ферментом 10 мин при 40 °С. Реакцию останавливали добавлением раствора 1М Na_2CO_3 . Образовавшийся в растворе ПНФ определяли спектрофотометрически при длине волны 400 нм, используя коэффициент молярного поглощения (ϵ = 18300 моль/см).

Целлюбозную активность определяли по начальной скорости гидролиза целлюбозы до глюкозы, инкубируя 2,5 мМ раствор целлюбозы с ферментом и отбирая пробы и анализируя в них глюкозу через 5, 10 и 15 мин. Концентрацию глюкозы в пробах определяли глюкозооксидазно-пероксидазным методом [16].

Активность ферментов выражали в международных единицах: 1 ед. 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 [17].

Растительные субстраты. В качестве субстратов были использованы: измельченные (в ОАО ГосНИИ биосинтеза белковых веществ на планетарной мельнице-активаторе типа АГО-2С, до частиц размером 1–3 мкм) обессмоленная сосновая древесина, осинная древесина и тростниковый жом (багасса).

Гидролиз растительных субстратов. Эксперимент проводили в термостатируемой при 50 °С ячейке,

помещенной на качалку INNOVA 40 Thermo Shaker (США). Концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 100 г/л (в пересчете на сухое вещество), реакцию проводили в 0,1 М Na-ацетатном буфере, при перемешивании со скоростью 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 β -глюкозидазный (целлобиазный) ферментный препарат F10 из расчета 40 ед. целлобиазной активности на 1 г сухого субстрата. Гидролиз проводили двое суток. Контрольным служил эксперимент, в котором вместо раствора ферментных препаратов в реакционную смесь добавляли соответствующее количество буферного раствора.

Реакционная ячейка представляла 50-мл пластиковый сосуд с крышкой. Для 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 10 тыс. об./мин и измеряли в супернатанте концентрации ВС — методом Шомоди–Нельсона [14] и глюкозы — глюкозооксидазопероксидазным методом [16].

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 использовали систему низкого давления Econo-System фирмы «BioRad» (США). Ферментный препарат обессоливали на колонке с акрилексом П2 фирмы «Reanal» (Венгрия) в 20-мМ буфере пиперазин-НСl, рН = 5,5. Далее проводили анионообменную хроматографию на колонке с носителем Source 15Q. Образец наносили в стартовом буфере Bis-Tris/НСl при рН 6,8; связавшиеся белки элюировали градиентом концентрации NaCl. Не связавшиеся с Source 15Q белки подвергали фракционированию посредством гидрофобной хроматографии на колонке Source 15Iso, элюирование белков проводили при начальной концентрации сульфата аммония 1,4 М в линейном ниспадающем градиенте (50 мМ Na-ацетатный буфер, рН = 5,0). В полученных при элюировании фракциях определяли авицеллазную, КМЦ-азную, ксиланазную и β -глюкозидазную активности, а также содержание белка.

Результаты и их обсуждение

Получение ферментных препаратов. Методами генетической инженерии и микробиологии в исходный штамм-продуцент были трансформированы экспрессионные конструкции, несущие гены β -глюкозидазы *A.niger* (bglI) и ксиланазы *P.canescens* (xylA) под контролем гистонового промотора H4.1. Из культуральной жидкости новых штаммов-продуцентов β -глюкозидазы и ксиланазы были получены лиофильно высушенные сухие ферментные препараты PV- β -Glu и PV-Xyl. В качестве контрольных были взяты ферментные препараты на основе исходного штамма *P.versiculorum* — PV-151 и коммерческий препарат Spezyme CP. ДДС-электрофорез ферментных препаратов представлен на рис. 1.

Содержание белка и удельная активность по отношению к разным субстратам использованных ферментных препаратов представлены в табл. 1, из которого видно, что препарат PV- β -Glu обладает наибольшими удельными активностями по отношению к целлобиозе и п-НФ- β -D-глюкопиранозиду. Наибольшая ксиланазная активность наблюдалась для препарата PV-Xyl (17,8 ед./мг). Коммерческий контрольный препарат Spezyme CP отличался высокими целлюлазными активностями — КМЦ-азной

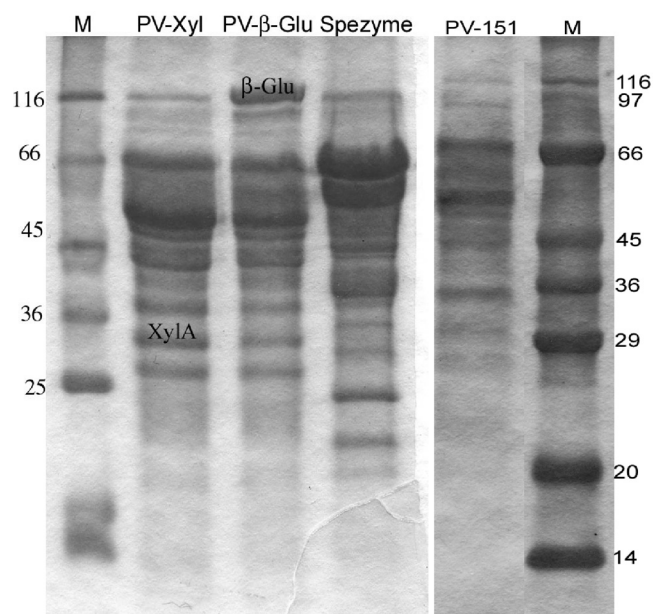


Рис. 1. Данные ДДС-Na-ПААГ-электрофореза рекомбинантных ферментных препаратов (PV- β -Glu и PV-Xyl), контрольного ферментного препарата штамма *P.versiculorum* (PV-151) и коммерческого препарата Spezyme CP; стандартный маркер для ДДС-Na-ПААГ-электрофореза (M)

Таблица 1

Удельная активность и концентрация белка сухих ферментных препаратов, ед./мг

Препарат	Белок, мг/г	КМЦ-аза	Авицелаза	Целлобиаза	Ксиланаза	β -Глюкозидаза
PV-Xyl	693	9,4	0,45	0,78	17,8	1,5
PV- β -Glu	732	11,6	0,46	9,72	13,3	3,8
Spezyme CP	153	21,4	1,6	0,19	5,8	0,44
PV-151 (контроль)	834	17,2	0,54	0,73	15	1,3

и авицелазной, что указывает на высокий гидролитический потенциал данного препарата.

Для идентификации гетерологичных белков из ДДС-электрофореза вырезали образцы геля, соответствующие искомым белкам. Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии трипсиновых гидролизатов белков с дальнейшим поиском в базах данных белков NCBI, MSDB и SWISS-PROT, дающих при трипсинолизе пептиды с идентичными молекулярными массами, вырезанные белки были определены с высокой степенью перекрытия (65 %) как β -глюкозидаза из *A.niger*, принадлежащая 3-й семье гликозил-гидролаз и эндо-1,4- β -ксилаза *P.canescens*, принадлежащая 10-й семье гликозил-гидролаз.

Состав сухих ферментных препаратов. Было проведено двухстадийное аналитическое фракционирование полученных сухих препаратов PV-151 (исходный контрольный препарат *P.versiculorum*), PV- β -Glu (препарат с клонированной β -глюкозидазой *A.niger*), PV-Xyl (препарат с клонированной ксиланазой *A.P.canescens*) и коммерческий препарат Spezyme CP. Для всех препаратов фракционированию подвергали одинаковое количество белка (10 мг). В полученных фракциях определяли авицелазную, КМЦ-азную, ксиланазную 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 [8] рассчитывали содержание соответствующего целевого фермента в общем пуле секретируемого белка. Следует отметить, что удельные активности гомогенных ксиланазы *A.P.canescens* и β -глюкозидазы *A.niger* соответствует свойствам нативных ферментов [11, 16].

В табл. 2 приведено содержание ферментов, входящих в состав анализируемых ферментных препаратов; видно, что основными белками всех фер-

ментных препаратов являлись целлобиогидролазы, содержание которых составило 51—69 % от общего пула белка в зависимости от препарата. Другими основными ферментами целлюлазного комплекса препаратов являлись эндоглюканазы — 15—22 % от общего пула белка (их количество также варьировалось в зависимости от препарата).

Исходный контрольный препарат *P.versiculorum* PV-151 имел в 69 % целлобиогидролаз и 16 % эндоглюканаз, а также всего 4 % собственных (гомологичных) β -глюкозидаз и 3 % ксиланаз. Компонентный состав коммерческого «референсного» ферментного препарата Spezyme CP несколько отличался от состава препарата PV-151. В его составе наблюдалось 51 % целлобиогидролаз и 22 % эндоглюканаз, при этом количество ксиланаз было в два раза выше, чем в препарате PV-151 — 7 %.

Компонентный состав ферментных препаратов, полученных на основе новых рекомбинантных штаммов, отличался от контрольного исходного

Таблица 2

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

Ферменты	PV-151*	PV-Xyl	PV- β -Glu	Spezyme CP
Целлобиогидролазы	69	60	61	51
Эндоглюканазы	16	18	15	22
Ксиланазы (гомологичные)	3	5	5	7
Ксиланазы (гетерологичные)	—	6	—	—
β -Глюкозидазы (гомологичной)	4	< 1	< 1	< 1
β -Глюкозидазы (гетерологичной)	—	—	13	—
Другие белки	8	10	5	20
* Контрольный.				

штамма. Наибольшее содержание целлюбогидролаз было отмечено для препарата PV- β -Glu (61 % от общего пула белка), содержание эндоглюканаз в нем составило 15 %, а гетерологичной β -глюкозидазы — 13 % (именно в увеличении содержания β -глюкозидазы состояло главное отличие этого препарата от контрольного препарата *P. verruculosum* PV-151). Для препарата PV-Xyl было отмечено такое же количественное соотношение целлюбогидролаз и эндоглюканаз, как и в описанном выше препарате PV- β -Glu (содержание β -глюкозидазы в нем составило менее 1 %), он также содержал 10 % гетерологичной ксиланазы А. Итак, полученные ферментные препараты PV- β -Glu и PV-Xyl не только обладали основным целлюлазным комплексом, но и содержали гетерологичные белки β -глюкозидазу *A. niger* и ксиланазу *P. canescens*, соответственно.

Полученные FPLC-фракционированием 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 целлюбогидролаз — увеличенную авицелазную активность, с увеличенным содержанием эндоглюканаз — увеличенную КМЦ-азную активность.

Гидролитическая (осахаривающая) способность ферментных препаратов. В качестве критерия осахаривающей способности препаратов принимали выход ВС и глюкозы через 24 ч гидролиза. Результаты осахаривания измельченных осины, сосны и багасы представлены на рис. 2, а—в).

При гидролизе измельченной сосновой древесины в отсутствие β -глюкозидазного ферментного препарата F10 наибольший выход продуктов наблюдался через 24 ч гидролиза при действии препаратом PV- β -Glu и составил 30 г/л_{ВС}, что на 20 % выше, чем при действии контрольного препарата *P. verruculosum* PV-151 и на 30 % больше по сравнению с лучшим «референсным» препаратом Spezyme CP (рис. 2, а). При действии препарата PV-Xyl в отсутствие β -глюкозидазного препарата F10 наблюдали увеличение выхода ВС на 20 % по сравнению с контрольным препаратом PV-151 и на 30 % по сравнению с коммерческим препаратом Spezyme CP. При дополнительном добавлении β -глюкозидазного препарата F10 наибольший выход продуктов наблюдался при действии препарата PV-Xyl и составил 36 и 33 г/л_{ВС} и глюкозы, соответственно. Разница с контрольным

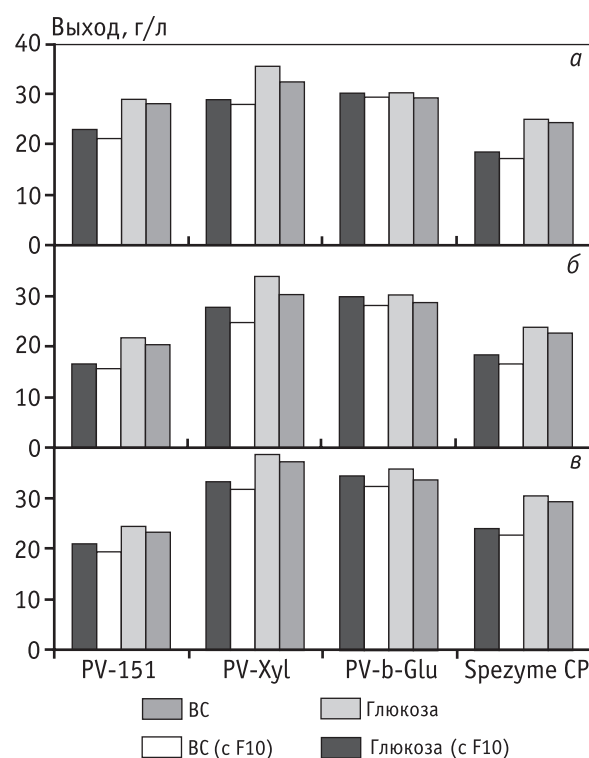


Рис. 2. Выход ВС и глюкозы при гидролизе измельченных сосновой (а) и осиновой (б) древесины и багасы (в) Условия: 50 °С, pH = 5, перемешивание 250 колебаний/мин, [S] = 100 г/л (сухая масса), 24-ч гидролиза Дозировка ферментных препаратов по белку – 5 мг/г сухого субстрата

препаратом PV-151 составила 20 %. Дополнительное внесение препарата F10 к препарату PV- β -Glu привело к увеличению выхода ВС на 7 % по сравнению с контрольным препаратом PV-151 и на 20 % по сравнению с препаратом Spezyme CP (см. рис. 2, а).

При гидролизе измельченной осиновой древесины наблюдалась схожая картина. Без добавления β -глюкозидазы F10 лучшую осахаривающую способность продемонстрировал препарат PV- β -Glu с выходами ВС и глюкозы — 30 и 28,5 г/л, соответственно. Разница с контрольным препаратом PV-151 составила 40 %. При действии препарата PV-Xyl в отсутствие β -глюкозидазного препарата F10 наблюдали увеличение выхода ВС и глюкозы на 30 % по сравнению с контрольным препаратом PV-151 и коммерческим препаратом Spezyme CP. При добавлении β -глюкозидазы F10 наибольший выход продуктов наблюдался при действии препаратом PV-Xyl и составил 34 г/л_{ВС}, что на 40 % больше по сравнению с контрольными препаратами. Дополнительное внесение препарата F10 к препарату PV- β -Glu привело

к увеличению выхода ВС и глюкозы в среднем на 25–30 % по сравнению с контрольным препаратом PV-151 и препаратом Spezyme CP (рис. 2, б).

При гидролизе измельченной багассы без добавления препарата β -глюкозидазы F10 лучшей осаживающей способностью также обладал препарат PV- β -Glu (35 г/л_{ВС} и 33 глюкозы/л), что на 40 % выше по сравнению с контрольным препаратом PV-151 и на 35 % выше выхода сахаров при использовании препарата Spezyme CP. При действии препарата PV-Xyl в отсутствие β -глюкозидазного препарата F10 наблюдали увеличение выхода ВС и глюкозы в среднем на 30–35 % по сравнению с контрольным и «референсным» препаратом. При совместном действии с препаратом F10, лучшая осаживающая способность была у препарата PV-Xyl с выходами ВС и глюкозы 39 и 37 г/л, соответственно. Разница по сравнению с действием контрольного препарата *P. verruculosum* PV-151 составила в среднем 25 % (рис. 2, в), следовательно, дополнительное добавление β -глюкозидазы F10 существенно увеличивает выход продуктов гидролиза (ВС и глюкозы) всех использованных субстратов для контрольного препарата *P. verruculosum* PV-151 и «референсного» препарата Spezyme CP, а также для препарата PV-Xyl. Важно, что в случае препарата PV- β -Glu дополнительное добавление целлюбиазы не приводило к увеличению выхода продуктов (см. рис. 2, в).

Сопоставление данных по составу ферментных препаратов и их активностей позволяет интерпретировать полученные данные. Отсутствие «усиливающего» действия дополнительного добавления в реакционную смесь β -глюкозидазного препарата F10 в случае препарата PV- β -Glu объясняется наличием в составе последнего значительного количества дополнительно привнесенной за счет генно-инженерных манипуляций в его состав гетерологичной β -глюкозидазы (13 % от общего содержания белка, см. табл. 2), обеспечивающей полную конверсию целлюбиозы в глюкозу в процессе гидролиза растительного сырья; поэтому дополнительное добавление β -глюкозидазного препарата F10 не влияет на выход продуктов.

Ферментный препарат с повышенным содержанием гетероличной ксиланазы (PV-Xyl) способен к более эффективному гидролизу гемицеллюлозной (ксилановой) матрицы растительного сырья, обеспечивая, таким образом, большую доступность фибрилл целлюлозы для целлюлолитических ферментов, что особенно заметно при совместном ис-

пользовании препарата PV-Xyl с дополнительно добавленным в реакционную смесь β -глюкозидажным препаратом F10.

Итак, биокатализаторы-ферментные препараты на основе новых рекомбинантных штаммов *P. verruculosum*, PV- β -Glu и PV-Xyl проявляли более высокую осаживающую способность по сравнению с контрольным препаратом PV-151, полученным с помощью исходного штамма *P. verruculosum* и по сравнению с «референсным» коммерческим препаратом Spezyme CP. Повышение уровня ксиланазной и β -глюкозидазной (целлюбиазной) активностей рекомбинантных ферментных препаратов *P. verruculosum* приводит к 20–30 %-ному увеличению выхода ВС и глюкозы при гидролизе таких видов измельченного растительного сырья как сосновая и осиновая древесина, а также багасса.

Заключение

Представленная работа направлена на создание высокоэффективных ферментных препаратов целлюлаз, являющихся биокатализаторами процесса биоконверсии природных полисахаридов растительной клеточной стенки до сбраживаемых сахаров и их последующего превращения в биотопливо (био-этанол, био-бутанол), а также другие полезные продукты. Уникальность разрабатываемой продукции заключается в создании новых комплексных биокатализаторов с увеличенной β -глюкозидазной (целлюбиазной) и ксиланазной активностью на базе рекомбинантного грибного штамма-продуцента карбогидраз *Penicillium verruculosum*, позволяющих эффективно гидролизовать типичные отходы деревообрабатывающей и лесопильной промышленности — осиновую и сосновую древесину, а также сельскохозяйственной — багассу. Новизна разработки в применении гистоновой системы экспрессии генов целевых белков, которая обеспечивает сохранение компонентного состава базового целлюлолитического комплекса при сохранении общего количества секретируемого белка.

Российская Федерация, обладающая одними из крупнейших в мире запасами возобновляемых растительных ресурсов и самыми значительными в пересчете на душу населения, не может отставать от наметившейся в последние годы в мире тенденции замещения традиционных ископаемых источников энергии и базовых химических продуктов на возобновляемые, с широким использованием современ-

ных наукоемких подходов «зеленой» химии. Для РФ, обладающей самыми значительными запасами древесины в мире биотрансформация целлюлозосодержащего сырья может играть определяющую роль в развитии новых наукоемких и конкурентноспособных отраслей перерабатывающей промышленности. При использовании растительного сырья нет необходимости занимать посевные площади под непродовольственные культуры — достаточно лишь рационально распорядиться существующими ресурсами лесного хозяйства (нетоварными сортами древесины) и отходами сельского хозяйства (багассой, свекловичным жомом). Применение новых ферментных биокатализаторов, полученных в представленной работе, приводит к более полному гидролизу растительных отходов лесоперерабатывающей и сельскохозяйственной промышленности, увеличению выхода сбраживаемых сахаров, что значительно удешевляет стадию биоконверсии растительных полисахаридов.

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. *Dashtban M., Schraft H.* Fungal Biodegradation and Enzymatic Modification of Lignin// *Int. J. of Biochemistry and Molecular Biology.* 2010. Vol. 1. P. 36.
2. *Zhang Y.-H., Himmel M., Mielenz J.* Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies// *Biotech. Adv.* 2006. Vol. 24. P. 452.
3. *Castellanos O.F., Sinitsyn A.P., Vlasenko E.Yu.* Comparative evaluation of hydrolytic efficiency toward microcrystalline cellulose of *Penicillium* and *Trichoderma* cellulases// *Bioresource Technol.* 1995. Vol. 52. P. 119.
4. *Скомаровский А.А., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Соловьева И.В., Бубнова Т.В., Кондратьева Е.Г., Синицын А.П.* Гидролитическая способность ферментных препаратов из грибов родов *Penicillium* и *Trichoderma*// *Прикл.биохимия и микробиология.* 2005. № 41. № 2. С. 210.
5. *Скомаровский А.А., Марков А.В., Гусаков А.В., Кондратьева Е.Г., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Матыс В.Ю., Синицын А.П.* Новые целлюлазы для высокоэффективного гидролиза лигноцеллюлозной биомассы// *Прикл.биохимия и микробиология.* 2006. Т. 42. № 6. С. 674.
6. *Berlin A., Gilkes N., Kilburn D., Bura R., Skomarovsky A.A., Markov A.V., Okunev O.N., Gusakov A.V., Maximenko V., Gregg D., Sinitsyn A.P., Saddler J.* 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.175-184.
7. *Kurabi A., Berlin A., Gilkes N., Kilburn D., Bura R., Robinson J., Skomarovsky A.A., Markov A.V., Okunev O.N., Gusakov A.V., Dan X., Gregg D., Sinitsyn A.P., Saddler J.* Enzymatic hydrolysis of steam-exploded and ethanol organosolv-pretreated Douglas fir by novel and commercial fungal cellulases// *Appl.Biochem.Biotechnol.* 2005. Vol. 121-124. P. 219.
8. *Скомаровский А.А.* Компонентный состав и гидролитическая способность ферментного комплекса *Penicillium verruculosum*: Автореф. канд. дисс, М.: Москва, 2006.
9. *Aslanidis C., de Jong J.P.* Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR) // *Nucl. Acids Research.* 1990. Vol. 18, P. 6069.
10. *Belshaw N. P., Haigh N. M., Fish D. B. Archer A.* Use of a histone H4 promoter to drive the expression of homologous and heterologous proteins by *Penicillium funiculosum*// *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002. Vol. 60. P. 455.
11. *Синицына О.А., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Серебряный В.А., Вавилова Е.А., Винецкий Ю.П., Синицын А.П.* Рекомбинантная эндо- β -1,4-ксилаза *Penicillium canescens*// *Биохимия.* 2003. Т. 68. № 12. С. 1631.
12. Пат. РФ 2288267, зарегистрирован в 2006 г.
13. *James P.* Proteome research: mass spectrometry// *Springer-Verlag, Berlin,* 2001.
14. *Синицын А.П., Черноглазое В.М., Гусаков А.В.* // Методы исследования и свойства целлюлолитических ферментов. М.: ВИНТИ, 1990. Т. 25. С. 30.
15. *Короткова О.Г., Семенова М.В., Морозова В.В., Зоров И.Н., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Синицын А.П.* Выделение и свойства грибных β -глюкозидаз// *Биохимия.* 2009. Т. 74. № 5. С. 699.
16. *Березин К.В., Рабинович М.Л., Синицын А.П.* // Биохимия. 1977. т. 42. № 9. С. 1631.
17. *Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.*// Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. С. 461.