

УДК 573.6/577.151/579.66/663.15

## ВОЗМОЖНОСТИ ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЫ ГРИБА *Penicillium verruculosum* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ЭФФЕКТИВНУЮ ДЕСТРУКЦИЮ ВОЗОБНОВЛЯЕМОЙ РАСТИТЕЛЬНОЙ БИОМАССЫ (ОБЗОР)

© 2020 г. А. П. Сеницын<sup>1,2</sup>, О. А. Сеницына<sup>2</sup>, И. Н. Зоров<sup>1,2</sup>, А. М. Рожкова<sup>1,2</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: amrojko@yahoо.com

Поступила в редакцию 24.04.2020 г.

После доработки 11.06.2020 г.

Принята к публикации 02.07.2020 г.

В обзоре систематизированы данные по использованию реципиентного штамма *Penicillium verruculosum* В1-537 (ΔniaD) для получения продуцентов, ферментов, вспомогательных по отношению к базовому целлюлазному комплексу, увеличивающих его эффективность – β-глюкозидазы, полисахаридмонооксигеназы, а также ксиланаз. Особенностью штамма *P. verruculosum* является секреция базового комплекса целлюлаз, состоящего из целлобиогидролаз и эндоглюканаз, которые по своей гидролитической способности превосходят наиболее широко используемые в лабораторной и промышленной практике штаммы *Hypocrea (Trichoderma)*. Использование возможностей экспрессионной системы *P. verruculosum* В1-537 (ΔniaD) позволяет вводить в состав базового комплекса целлюлаз новые ферменты, необходимые для увеличения его общей гидролитической активности, и создавать ферментные препараты адаптированные для конверсии различных видов возобновляемой растительной биомассы (ВРБ). Использование экспрессионной системы на основе гриба *P. verruculosum* позволило увеличить способность базового целлюлазного комплекса к конверсии различных видов ВРБ.

**Ключевые слова:** экспрессионная система, целлюлазы, гемицеллюлазы, возобновляемая растительная биомасса, *Penicillium verruculosum*

**DOI:** 10.31857/S0555109920060161

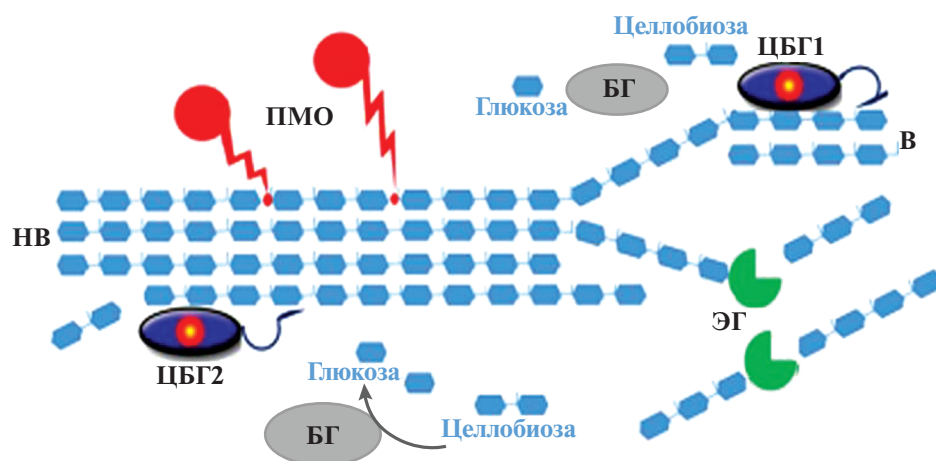
Возобновляемая растительная биомасса (ВРБ), основными компонентами которой являются целлюлоза, гемицеллюлозы и лигнин, составляет основную часть органического материала на Земле и является практически неисчерпаемым источником сырья и энергии [1]. Разработка эффективных способов ее использования является одной из наиболее приоритетных задач современной промышленной биотехнологии. Применяемые в настоящее время подходы для переработки ВРБ включают стадии ее предварительной обработки, ферментативного гидролиза полисахаридов до простых сахаров и их трансформацию в коммерчески востребованные продукты – органические спирты и кислоты, алканы, алкены, фураны, диолы и многие другие органические соединения, которые далее используются в химической промышленности, производстве биотоплива и биопроизводителей [2–5].

Сдерживающей промышленное освоение процессов конверсии ВРБ является стадия фермен-

тативного получения сахаров, для реализации которой необходимо иметь в наличии соответствующие дешевые и активные ферменты [6].

Различные ВРБ, например, разные виды многолетних и однолетних растений, значительно отличаются друг от друга по компонентному составу и структуре [7]. Для достижения максимальной эффективности ферментативной конверсии конкретного вида ВРБ требуются ферментные препараты (ФП), обладающие оптимальным составом ферментов, необходимых для гидролиза именно для этого вида ВРБ. Тем не менее, производители промышленных ферментов часто предлагают ФП общего назначения, не адаптированные к максимально эффективному гидролизу различных видов ВРБ [8].

Микроскопические мицелиальные грибы являются основным источником коммерческих ФП целлюлаз и гемицеллюлаз, производимых в промышленном масштабе во многих странах мира, в



**Рис. 1.** Механизм ферментативной деструкции целлюлозы. БГ –  $\beta$ -глюкозидаза, ПМО – полисахаридмонооксигеназа, ЦБГ1 и ЦБГ2 – целлобиогидролазы 1 и 2 соответственно, ЭГ – эндоглюканаза, В – восстанавливающий и НВ – невосстанавливающий концы целлюлозных молекул.

том числе и в России, которые могут быть использованы для биоконверсии ВРБ. Долгое время считалось, что низшие грибы, относящиеся к роду *Hypocrea* (синоним *Trichoderma*), являются лидерами по секреции наиболее активных целлюлаз и гемицеллюлаз [9–11], поэтому коммерческие ФП целлюлаз на основе мутантных штаммов *T. reesei* (*H. jecorina*) наиболее распространены на рынке ферментов, а большинство исследований и разработок по биоконверсии ВРБ основаны на использовании целлюлаз *H. jecorina*. Однако такие ФП имеют ряд недостатков, наиболее существенным из которых является относительно низкая активность по отношению к ВРБ [8, 12, 13].

В последнее время стало очевидно, что существует альтернатива ФП *H. jecorina*. Целлюлазы, продуцируемые грибами рода *Penicillium* (синоним *Talaromyces*), как правило, превосходят ферменты *H. jecorina* по скорости гидролиза и выходу глюкозы из различных ВРБ при одинаковой концентрации белка или активности целлюлазы, что неоднократно было показано различными исследователями начиная с середины 1990 г. [14, 15]. Секвенирование и аннотация геномов *P. decumbens*, *P. funiculosum* и *P. verruculosum* показало, что эти виды грибов отличаются более богатым набором ферментов, катализирующих расщепление компонентов ВРБ, по сравнению с *H. jecorina*. Еще одной причиной высокой эффективности целлюлазных комплексов грибов *Penicillium* является высокая удельная активность их ключевых компонентов, в первую очередь целлобиогидролаз 1 и 2 (ЦБГ1 и ЦБГ2), по сравнению с соответствующими ферментами *H. jecorina* [15].

Из дикого целлюлозолитического штамма *P. verruculosum* WA30 методом ступенчатого мутагенеза и последующей селекции был получен вы-

сокопродуктивный штамм *P. verruculosum* B221-151 [16], из которого в дальнейшем также путем мутагенеза был получен реципиентный штамм *P. verruculosum* B1-537 ( $\Delta niaD$ ), сохранивший высокую секреторную способность до 50–60 г/л внеклеточного белка. Этот штамм является ауксотрофом с дефектом в гене *niaD*, кодирующем нитратредуктазу, которая принимает участие в ассимиляции нитратного азота. Штамм *P. verruculosum* 537 ( $\Delta niaD$ ) отличался редуцированным катаболизмом глюкозы за счет случайной мутации в репрессоре *SteA*, что позволяло культивировать его на среде с глюкозой, а также в режиме с подпиткой глюкозой. Биосинтез ферментов штамма индуцировался целлюлозой и целлоолигосахаридами.

Реципиентный штамм *P. verruculosum* B1-537 ( $\Delta niaD$ ) сохранял способность продуцировать комплекс внеклеточных целлюлаз, активность которых превосходила активность комплекса штаммов *Hypocrea* [17]. Целлюлазный комплекс *P. verruculosum* может быть с успехом использован для биоконверсии ВРБ и превращение ее в глюкозу [15, 18], а использование возможностей экспрессионной системы *P. verruculosum* позволяло изменять содержание и состав тех или иных ферментов комплекса (вводить в его состав новые ферменты), чтобы регулировать состав ферментного комплекса для максимально эффективной конверсии различных видов ВРБ.

Реципиентный штамм *P. verruculosum*, таким образом, был использован для создания новых штаммов и получения ФП для эффективной конверсии различных видов ВРБ. Схема действия целлюлазного комплекса приведена на рис. 1.

Строение целлюлозы обуславливает ее высокую химическую стабильность и устойчивость к ферментативному гидролизу. Для эффективного

гидролиза целлюлозы требуется совместное действие ферментов эндодеполимераз, эндоглюканаз (ЭГ), которые расщепляют целлюлозные цепи преимущественно на аморфных участках фибрилл целлюлозы. При этом образуются восстанавливающие (В) и невосстанавливающие (НВ) свободные концы, представляющие собой субстрат для действия экзо-деполимераз, целлобио-гидролаз (ЦБГ1, ЦБГ2), которые последовательно отщепляют остатки целлобиозы от концов полимерной цепи (гидролиз осуществляется по процессивному механизму). ЦБГ могут атаковать как кристаллические, так и аморфные зоны субстрата.

К вспомогательным (синергетическим) ферментам, увеличивающим эффективность действия ферментов базового комплекса на ВРБ, относятся  $\beta$ -глюкозидазы (целлобиазы), литические полисахаридмонооксигеназы (ПМО), а также гемицеллюлазы (преимущественно ксиланазы) [15]. Содержание вспомогательных ферментов в составе базового комплекса *P. verruculosum* ограничено, то есть лимитировано физиологией гриба [19], поэтому для увеличения гидролитической способности целлюлозного комплекса представлялось целесообразным увеличить уровень секреции вспомогательных ферментов.

$\beta$ -Глюкозидаза (БГ) осуществляет конверсию целлобиозы и целлоолигосахаридов в глюкозу, что является важным шагом не только для получения глюкозы как конечного продукта ферментативной деструкции целлюлозы, но и для увеличения эффективности процесса ферментативной конверсии целлюлозы ЦБГ и ЭГ, поскольку целлобиоза и целлоолигосахариды ингибируют эти ферменты, в особенности ЦБГ. Глюкоза ингибирует эти ферменты в значительно меньшей степени [15].

ПМО не обладают гидролитической активностью, но играют важную роль в деструкции целлюлозы, окисляя целлюлозную цепь в произвольном месте на поверхности кристалла, что приводит к образованию свободных концевых групп для действия ЦБГ. Кроме того, заряженные группы на образующихся концах способствуют аморфизации целлюлозы и повышают ее доступность для ферментов [15].

Гемицеллюлазы (ксиланазы, КСИЛ) осуществляют деструкцию, входящих в состав ВРБ гемицеллюлаз (ксиланов), что приводит к увеличению степени конверсии сырья и увеличению доступа целлюлолитических ферментов к поверхности субстрата.

$\beta$ -Глюкозидаза (КФ 3.2.1.21, БГ). Для получения высокоактивного штамма *P. verruculosum* F10 — продуцента  $\beta$ -глюкозидазы А (БГА) *A. niger* (GH3, 116 кДа, рI 4.55) использовали реципиентный штамм *P. verruculosum* B1-537 ( $\Delta$ niaD). Генетиче-

ская конструкция для обеспечения экспрессии гена *bgI1* содержала целевую кодирующую последовательность, связанную с промотором и терминатором “сильного” индуцибельного промотора гена ЦБГ1 (*cbh1*) — мажорного фермента, продуцируемого *P. verruculosum* (в качестве сигнальной последовательности использовали сигнальный пептид БГА) [20].

Создание штамма *P. verruculosum* F10 позволило при культивировании в лабораторных ферментерах достигнуть более 1300 ед./мл  $\beta$ -глюкозидазной активности в культуральной жидкости (КЖ), определенной по скорости гидролиза *n*-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкозида (пНФГ) в качестве субстрата, и 1700 ед./мл активности целлобиазы (определенной по скорости гидролиза целлобиозы). Это примерно в 25–30 раз выше, чем соответствующие активности в КЖ реципиентного штамма. Сухой ФП F10, полученный лиофильным высушиванием КЖ штамма *P. verruculosum* F10, содержал ~80% гетерологичной БГА (табл. 1) и 35 300 и 46 700 ед./г БГА и целлобиазной активности соответственно [8]. Препарат содержал также около 3% гомологичной БГ от общего количества секретируемого белка и около 1100 ед./г активности БГ (~600 ед./г активности целлобиазы). В отличие от БГ, продуцируемых штаммами родов *Penicillium*, *Hypocrea* и *Chrysosporium*, БГА являлась “истинной” целлобиазой, то есть ее активность по целлобиозе превышала активность по пНФГ, и уменьшалась в ряду целлобиоза > целлоолигосахариды с увеличивающейся степенью полимеризации последних [21].

Было проведено исследование влияния ФП F10 на результаты конверсии целлюлозосодержащего сырья — отходов резки пергамента под действием ФП B1-537, полученным из реципиентного штамма *P. verruculosum* B1-537 ( $\Delta$ niaD) [22]. Для сравнения использовали коммерческий ФП BioACE, полученный на основе штамма-продуцента *H. jecorina*, основными компонентами которого, как и ФП B1-537 были ЦБГ и ЭГ. ФП BioACE, также как и ФП B1-537, имел низкую активность БГ. В табл. 2 приведены значения удельных активностей использованных ФП по отношению к различным субстратам. Активность по фильтровальной бумаге (АФБ) и микрокристаллической целлюлозе (МКЦ) отражают уровень целлобиогидролазной активности, активность по КМЦ — уровень эндоглюканазной активности, по пНФГ и целлобиозе — БГ и целлобиазную активности, соответственно. ФП B1-537 и BioACE имели сопоставимые по величине значения удельных активностей по АФБ, МКЦ, КМЦ, пНФГ и целлобиозе. ФП F10 характеризовался более низким уровнем активности по отношению к полисахаридным субстратам, однако существенно превосходил по значениям удельной активности по пНФГ и целлобиозе.

**Таблица 1.** Состав лабораторных ферментных препаратов, содержащих основные и вспомогательные гидролитические ферменты (состав ферментных препаратов определяли с помощью высокоэффективной анионообменной и гидрофобной хроматографии)

Ферментный препарат, штамм	Ферменты, % от общего содержания белка					
	КСИЛА	КСИЛЗ	БГ	ЦБГ	ЭГ	Др.
<i>P. verruculosum</i> F10	—	—	80	18	1	—
<i>P. verruculosum</i> CV12	—	—	24*	43	8	24
<i>P. verruculosum</i> Hist-БГА	—	—	14**	61	9	14
<i>P. verruculosum</i> КСИЛА	—	18***	3	47	10	22
<i>P. verruculosum</i> КСИЛЗ	17***	—	2	39	15	27
<i>P. verruculosum</i> В1-537	—	—	3****	60	12	25

\* Содержание гомологичной БГ – 3%; \*\* содержание гомологичной БГ – 1%; \*\*\* содержание гомологичной ксиланазы – 3%; \*\*\*\* содержание гомологичной БГ.

**Таблица 2.** Удельная активность ФП (ед./мг белка), использованным для гидролиза ВРБ, по отношению к различным субстратам

Ферментный препарат	АФБ	МКЦ	КМЦ	пНФГ	Целлобиоза
F10	0.19	0.1	5.9	45.5	60.2
В1-537	0.92	0.7	18.3	1.7	0.73
БиоАСЕ (“Dyadic International Co.”, США)	0.83	0.6	17.4	0.1	0.1
Accelerase 1000 (“DuPont/Danisco”, США)	1.7	1.2	12.3	3.6	2.7
Accelerase 1000 (“DuPont/Danisco”, США)	1.2	0.8	10.5	3.8	2.3
Accelerase DUET (“DuPont/Danisco”, США)	1.1	0.8	7.9	3.1	2.2
Cellic CTec-1 (“Novozymes”, Дания)	0.7	0.3	10.9	2.8	2.4
Cellic CTec-2 (“Novozymes”, Дания)	1.7	1.2	12.3	3.6	2.7

В экспериментах по ферментативному гидролизу отходов пергаменты использовали смесь ФП В1-537 + ФП F10 и БиоАСЕ + ФП F10. Кроме того, для гидролиза использовали также отдельные ФП целлюлазы без добавления ФП F10. На 1 г сухого субстрата вносили 10 или 15 ед. целлюлазной активности (в расчете по АФБ), и 40 ед. ФП F10 (при расчете по пНФГ) при концентрации субстрата в реакционной смеси – 50 г/л.

Результаты ферментативного гидролиза отходов пергаменты представлены на рис. 2. Оба препарата целлюлаз (без добавления ФП F10) обеспечивали значительную глубину гидролиза субстрата. Наибольший выход глюкозы наблюдали при действии ФП В1-537 при двух концентрациях препарата. Добавление в реакционную смесь ФП F10 приводило к заметному увеличению выхода глюкозы как при гидролизе ФП В1-537, так и БиоАСЕ: за 24 ч – на 20–56%, за 48 ч – на 31–43%, за 72 ч – на 6–15%. Максимальный выход глюкозы в результате ферментативного гидролиза отходов пергаменты под действием ФП В1-537 в течение 72 ч составил 38 г/л (15 ед. по ФБ) в присутствии БГ,

что соответствовало практически 70%-ной глубине конверсии субстрата.

Присутствие в реакционной смеси избытка БГА позволило снизить дозировку целлюлазных ФП В1-537 и БиоАСЕ на 33%: выход глюкозы при гидролизе пергаменты ФП в дозе 10 ед. АФБ на 1 г субстрата в присутствии избытка БГА превышал выход глюкозы при внесении ФП 15 ед. АФБ на 1 г субстрата в отсутствие БГА.

Было проведено сравнение эффективности использования смеси ФП В1-537 + ФП F10 при гидролизе различных видов ВРБ с эффективностью целлюлазных ФП, специально созданных для биоконверсии ВРБ (обогащенных БГ), таких как Accelerase 1000, Accelerase 1500, Accelerase DUET ([http://genencor.com/fileadmin/user\\_upload/genencor/documents/GEN-00110\\_DuetBrochure10-low.pdf](http://genencor.com/fileadmin/user_upload/genencor/documents/GEN-00110_DuetBrochure10-low.pdf)), и Cellic CTec-1, Cellic CTec-2 (<https://www.novozymes.com/en/advance-your-business/bioenergy/cellic>) [8]. Коммерческие ФП имели, в целом, сопоставимые с ФП В1-537 удельные активности по ФБ, МКЦ и КМЦ, но превосходили ФП В1-537 по активности в отношении пНФГ и целлобиозы,

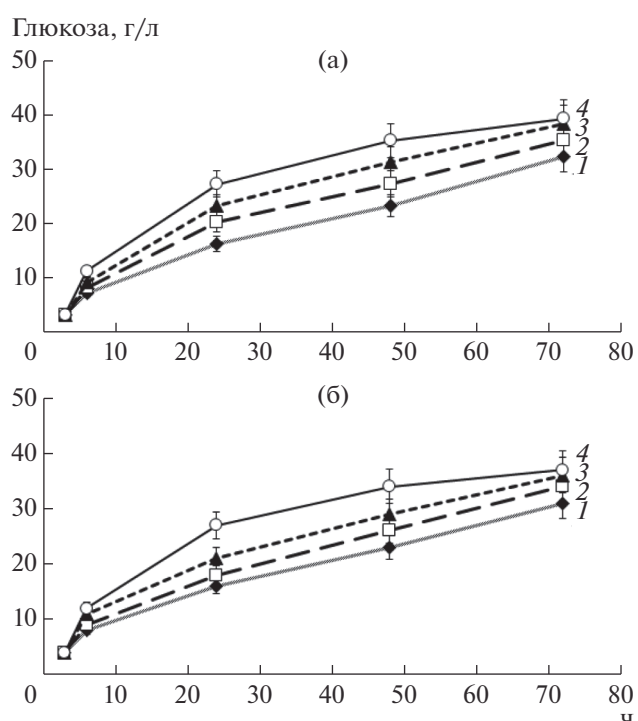
при этом ФП F10 значительно превосходил коммерческие ФП по активности по пНФГ и целлюлозе (табл. 2).

Ферментативный гидролиз ВРБ проводили как коммерческим ФП, так и ФП В1-537 в реакционной смеси при концентрации 10 мг белка/г сухого вещества субстрата; ФП F10 добавляли из расчета 40 ед./г сухого вещества субстрата (концентрация субстрата в реакционной смеси – 100 г/л).

В качестве ВРБ использовали предобработанные с помощью парового взрыва стебли кукурузы, багассу (стебли сахарного тростника), а также измельченную на планетарной шаровой мельнице древесину сосны и осины. Первые два вида ВРБ традиционно получают в промышленных масштабах в Бразилии, США, а также в Юго-Восточной Азии для производства биотоплива 2 поколения (биоэтанола из целлюлозы). Древесина хвойных и лиственных пород является основным крупнотоннажным отходом лесосечного производства, а также деревообрабатывающих производств различного профиля, характерных для России, Европы и Канады.

Выход восстанавливающих сахаров (ВС) после 48 ч гидролиза приведен в табл. 3. Смесь препаратов В1-537 + F10 наиболее эффективно гидролизовала измельченную древесину сосны и осины, по сравнению с использованными коммерческими ФП. При гидролизе предобработанных кукурузных стеблей и багассы смесью препаратов В1-537 + F10 эффективность процесса уступала эффективности Cellic СТес-2, но была выше эффективности действия остальных коммерческих ФП.

В табл. 3 приведены также результаты гидролиза микрокристаллической целлюлозы (МКЦ), которая в отличие от других использованных субстратов практически не содержит лигнина и гемицеллюлоз. Глубина гидролиза МКЦ всеми исследуемыми ФП оказалась выше степени гидролиза природных ВРБ. При этом максимальный выход ВС был получен при использовании ФП



**Рис. 2.** Выход глюкозы при гидролизе отходов пергамента ФП *P. verrucosum* В1-537 (а) и *T. reesei* BioACE (б) в отсутствие (1, 2) и в присутствии (3, 4) избытка БГА *P. verrucosum* F10. (Дозировка целлюлазных препаратов: 1 и 3 – 10, 2 и 4 – 15 ед. АФБ/г сухого субстрата, ФП F10 – 40 ед. (по пНФГ)/г сухого субстрата. Условия гидролиза: [S] = 50 г/л (сухой вес), 50°C, pH 5, перемешивание – 250 об./мин. Глюкозу определяли глюкозооксидазным методом.)

Cellic СТес-2 и смеси препаратов В1-537 + F10, показавших также и наибольшую эффективность при гидролизе различных видов ВРБ.

Таким образом, создание высокопродуктивного рекомбинантного штамма *P. verrucosum* F10 – продуцента БГА было важным шагом на пути получения высокоэффективного ФП, предна-

**Таблица 3.** Выход ВС при гидролизе различных видов растительного сырья\*

Ферментный препарат	Выход ВС**, мг/мл за 48 ч				МКЦ
	сырье, предобработанное паровым взрывом		сырье, предобработанное измельчением на планетарной шаровой мельнице		
	кукурузные стебли	багасса	сосна	осина	
Accelerase 1000	39	40	31	41	77
Accelerase 1500	39	35	29	41	77
Accelerase DUET	37	43	30	50	76
Cellic СТес-1	26	32	23	23	61
Cellic СТес-2	54	51	32	48	84
В1-537 + F10	52	49	32	52	75

\* Дозировка ферментных препаратов 10 мг белка на 1 г сухого вещества субстрата, для смеси препаратов В1-537 + F10 дозировка F10 – 40 ед. (по пНФГ)/г сухого субстрата. (Условия гидролиза: [S] = 100 г/л, 50°C, pH 5, перемешивание – 250 об./мин). \*\* Концентрацию ВС определяли методом Нельсона–Шомоди.

значенного для биоконверсии различных видов ВРБ и получения из них сахаров.

Возможности экспрессионной системы *P. verruculosum* можно продемонстрировать на примере получения других продуцентов БГА *A. niger*. При использовании *cbh1* промотора помимо штамма F10, препарат из которого содержал 80% БГ от общего пула секретируемых белков, был получен также рекомбинантный штамм *P. verruculosum* CV12, который характеризовался меньшим уровнем экспрессии БГА. ФП, полученный из КЖ этого штамма, содержал 24% БГА. При этом в отличие от штамма F10, был полностью сохранен целлюлазный комплекс *P. verruculosum* (табл. 1).

С использованием конститутивного гистонового промотора *hist4*, существенно более “слабого”, чем промотор *cbh1*, был создан еще один рекомбинантный штамм *P. verruculosum* Hist4-БГА – продуцент БГА *A. niger*. Полученный из его КЖ препарат содержал 13% гетерологичной БГ и тоже характеризовался сохранением базового целлюлазного комплекса (табл. 1) [23].

Было проведено сравнение эффективности гидролиза измельченной на планетарной шаровой мельнице осиновой древесины различными препаратами – смесью ФП В1-537 + F10, а также ФП CV12 и Hist4-БГ. Полученные результаты по образованию ВС и степени гидролиза субстрата различными ФП были близки и существенно превосходили полученные при воздействии одного ФП В1-537 [24].

Приведенные выше результаты показали существенную роль БГ для увеличения эффективности гидролиза целлюлазного комплекса *P. verruculosum*. Увеличение синтеза БГ может быть достигнуто с помощью различных подходов, в том числе, основанных на использовании разных промоторов для экспрессионной системы *P. verruculosum*.

**Полисахаридмонооксигеназы (ПМО).** Еще одним вспомогательным ферментом для целлюлазного комплекса является ПМО. Ферменты осуществляющие окислительную деструкцию целлюлозы и других природных полисахаридов были открыты в 2010–2011 гг. [15]. Следует отметить, что, как белки, ПМО были известны и ранее, но их ошибочно относили к 61 семейству гликозил-гидролаз. После установления принадлежности данных ферментов к классу оксидоредуктаз их классифицировали как семейство AA9 вспомогательных активностей (Family 9 of Auxiliary Activities; <http://www.cazy.org/AA9.html>).

Характерным свойством всех ПМО является их зависимость от ионов двухвалентных металлов. Как правило, это ион  $\text{Cu}^{2+}$ , который прочно связан в активном центре фермента за счет координации с двумя остатками гистидина. Реакции, катализируемые ПМО, также требуют наличия

молекулы кислорода и донора электронов в реакционной смеси. В качестве последнего часто используют галлиевую или аскорбиновую кислоты, а также другие химические соединения, которые являются восстановителями [15]. В природных условиях донором электрона может являться фермент целлобиозодегидрогеназа, которая катализирует сопряженную реакцию окисления целлобиозы (одного из главных продуктов гидролиза целлюлозы), а также фенольные соединения – продукты биodeградации лигнина, являющегося одним из основных компонентов ВРБ.

ПМО осуществляют взаимодействие с гидролитическими ферментами базового целлюлазного комплекса, приводя в итоге к увеличению выхода глюкозы [15]. С использованием гомогенных ферментов было показано, что оптимальное содержание ПМО в составе целлюлазного комплекса должно составлять ~10% [25], причем введение ПМО в целлюлазный комплекс не должно нарушать его целостность и сбалансированность. Для соответствия этим требованиям была создана система экспрессии на основе индуцибельного промотора гена глюкоамилазы *glc1* гриба *P. verruculosum* [26]. Поскольку промотор гена *glc1* является более “слабым”, чем промотор гена *cbh1*, использование такой системы экспрессии позволяет вводить в состав секретируемых рекомбинантным штаммом-продуцентом ферментов ограниченное количество ПМО, не нарушая секрецию базового комплекса целлюлаз. В качестве целевой была выбрана ПМО *T. reesei* (ПМО-Tr, КФ 1.14.99.54 и 1.14.99.56, AA9, 39 кДа, pI 2,8), кодируемая геном *eglIV*, поскольку фермент обладал большей активностью по сравнению с другими исследованными ПМО [25].

Генетическую трансформацию реципиентного штамма осуществляли с помощью плазмидного вектора, несущего ген *eglIV*, содержащий промотор гена *glc1* и терминатор гена *cbh1*. В результате был получен рекомбинантный штамм *P. verruculosum* gla-ПМО-Tr, после культивирования которого в лабораторных ферментерах были получены ФП Gla-ПМО-Tr, содержащие 9–10% гетерологичной ПМО-Tr с сохранением базового целлюлазного комплекса *P. verruculosum* (табл. 4).

Необходимо отметить, что с помощью экспрессионной системы на основе промотора гена *glc1* был получен рекомбинантный штамм *P. verruculosum* gla-БГА, продуцент гетерологичной БГА *A. niger*, уровень экспрессии которой также составил около 10% от общего секретируемого белка, при сохранении базового целлюлазного комплекса (состав ФП gla-БГА, полученного в лабораторном ферментере, приведен в табл. 4).

Была исследована способность к биоконверсии осиновой древесины, измельченной на планетарной шаровой мельнице (концентрация в реакци-

**Таблица 4.** Компонентный состав лабораторных ФП, содержащих ПМО и БГ (состав ферментных препаратов определяли с помощью высокоэффективной анионообменной и гидрофобной хроматографии)

Ферментный препарат, штамм	Ферменты, % от общего белка				
	ПМО	БГ	ЦБГ	ЭГ	другие
<i>P. verruculosum</i> gla-ПМО-Тг	9–10	3*	54	10	23–24
<i>P. verruculosum</i> gla-БГА	–	13**	55	10	22
<i>P. verruculosum</i> ПМО-Тг	24	3*	40	11	22
<i>P. verruculosum</i> В1-537	–	3*	60	12	25

\* Содержание гомологичной БГ; \*\* содержание гомологичной БГ – 3%.

онной смеси – 100 г/л), препаратами Gla-ПМО-Тг и Gla-БГА, а также их смесью [26]. В качестве контроля использовали ФП В1-537. Концентрация глюкозы при использовании ФП Gla-ПМО-Тг через 48 ч составила 42 г/л, что было на 10% выше концентрации продукта для контрольных ФП В1-537 (38 г/л), однако несколько ниже, чем для препарата Gla-БГА (52 г/л). При использовании же смеси препаратов Gla-ПМО-Тг и Gla-БГА (1 : 1) и сохранении общей дозировки ферментов по белку концентрация глюкозы достигла 59 г/л, что на 13% выше, чем для препарата Gla-БГА и на 56% выше по сравнению с контрольным препаратом В1-537.

Таким образом, синергетический эффект от введения двух гетерологично экспрессируемых ферментов (ПМО и БГ) в состав целлюлазного комплекса *P. verruculosum* при конверсии измельченной осиновой древесины оказался выше, чем от введения какого-либо одного из этих ферментов. Важно подчеркнуть, что использование относительно слабого промотора гена *gla1* для экспрессии целевых ферментов позволило сохранить базовый уровень продукции ключевых целлюлаз, что в итоге и привело к заметному росту эффективности препаратов при конверсии растительного сырья.

Помимо описанного выше продуцента ПМО на базе реципиентного штамма *P. verruculosum* В1-537 ( $\Delta$ niaD) был получен высокоактивный штамм – продуцент ПМО-Тг, в котором экспрессия целевого гена находилась под контролем *cbh1* промотора [27, 28]. Этот штамм *P. verruculosum*-ПМО-Тг позволил при культивировании в лабораторных ферментерах получить ФП, содержащий 24% ПМО-Тг (содержание базовых целлюлаз в таком ФП несколько уменьшилось, табл. 4).

Было проведено сравнение эффективности конверсии измельченной на планетарной шаровой мельнице осиновой древесины, а также МКЦ с помощью ФП ПМО-Тг и контрольного ФП В1-537, полученного из КЖ реципиентного штамма. За критерий эффективности конверсии принимали выход глюкозы и ВС после 24 ч действия ферментов. Несмотря на пониженное содержание целлюлаз базового комплекса (табл. 4) ФП ПМО-Тг осуществлял конверсию субстратов эффектив-

нее, чем ФП В1-537, не содержащий ПМО. Выход ВС при гидролизе МКЦ препаратом ПМО-Тг был на 11%, а выход глюкозы – на 17% выше, чем в случае контрольного ФП. При конверсии измельченной осиновой древесины выходы ВС для ФП на основе рекомбинантного и исходного штаммов были близки, при этом выход глюкозы под действием ФП ПМО-Тг был на 35% выше по сравнению с ФП В1-537. Таким образом, ФП ПМО-Тг обеспечивал увеличение эффективности конверсии целлюлозосодержащего сырья по сравнению с ФП из *P. verruculosum* В1-537.

**Ксиланазы.** Содержание гемицеллюлоз (ксиланов) в различных видах ВРБ значительно варьирует [7], что требует индивидуального подбора состава ФП для наиболее эффективного гидролиза конкретных видов ВРБ. На основе реципиентного штамма *P. verruculosum* 537 ( $\Delta$ niaD) были получены несколько рекомбинантных штаммов, продуцирующих мультиферментные комплексы с различным соотношением целлюлазных и ксиланазной активностей.

Ксилан – один из основных компонентов гемицеллюлоз клеточной стенки растений и второй по распространенности природный полисахарид после целлюлозы. Поэтому ФП, предназначенные для гидролиза ВРБ со значительным содержанием ксиланов (например, кукурузные стебли, багасса, осиновая древесина), должны иметь повышенное содержание ксиланаз. Для увеличения ксиланазной активности базового штамма *P. verruculosum* были выбраны эндо- $\beta$ -1,4-ксиланаза А *P. canescens* (КСИЛА, КФ 3.2.1.8, GH10, 31 кДа, pI 8.5) и эндо- $\beta$ -1,4-ксиланаза 3 *T. reesei* (КСИЛЗ, GH10, 38 кДа, pI 9.1). С использованием *cbh1* промотора были созданы штаммы *P. verruculosum*-КСИЛА и *P. verruculosum*-КСИЛЗ [23, 28], при культивировании которых в лабораторных ферментерах получали КЖ с активностью ксиланазы около 2000 ед./мл. Содержание гетерологичных КСИЛ в ФП, составило 17–18% (с сохранением ферментов базового целлюлазного комплекса *P. verruculosum* (табл. 1).

Активность ксиланазы ФП КСИЛА и КСИЛЗ в 1.6–5.3 раза превосходила таковую контрольного ФП, полученного из КЖ реципиентного штам-

**Таблица 5.** Удельные активности ФП (ед./мг белка), содержащих ксиланазы, по отношению к различным субстратам

Ферментный препарат, штамм	МКЦ	КМЦ	пНФГ	Ксилан
<i>P. verruculosum</i> КСИЛА	0.2	2.9	3.3	69
<i>P. verruculosum</i> КСИЛЗ	0.1	18.0	1.1	21
Accelerase XY	0.1	0.8	0.6	92
<i>P. verruculosum</i> В1-537	0.7	18.3	1.7	13

ма *P. verruculosum* В1-537 ( $\Delta$ niaD) [18] (табл. 5). Активность по отношению к МКЦ (целлобиогидролазная активность) и КМЦ (эндоглюканазная активность) ФП, полученных из рекомбинантных штаммов, по сравнению с ФП из штамма-реципи-

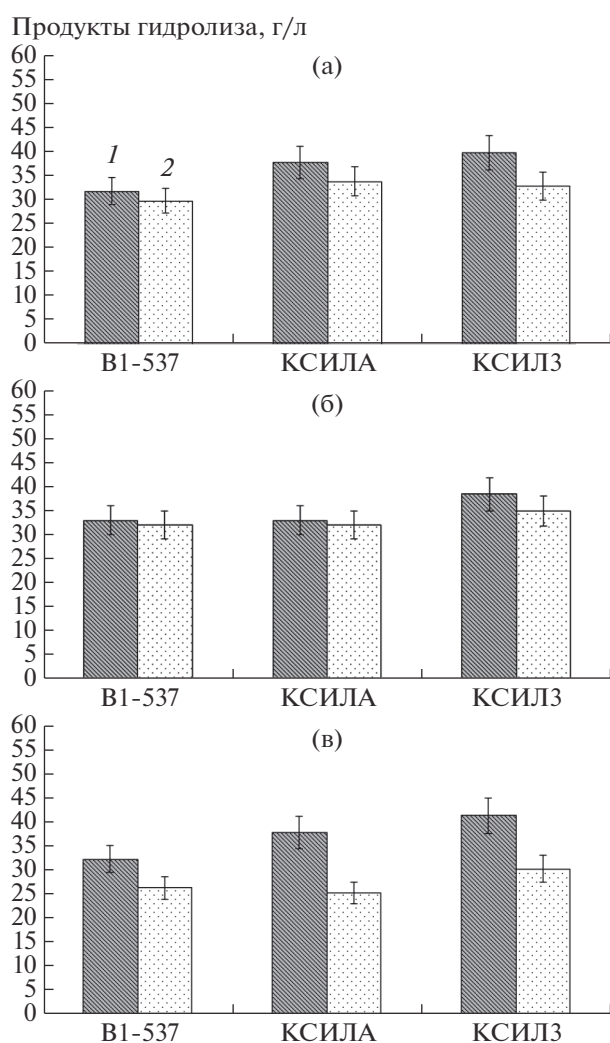
ента уменьшалась. В табл. 5 приведены удельные активности коммерческого ФП Accelerase XY, предназначенного для конверсии ксиланов ВРБ, который имел более высокую удельную активность ксиланазы, по сравнению с ФП КСИЛА или КСИЛЗ, однако существенно уступал им по величине удельных активностей по отношению к МКЦ, КМЦ и пНФГ.

Эффективность рекомбинантных ФП ксиланаз была оценена по степени конверсии различных видов ВРБ (выход ВС и глюкозы после 48 ч действия ФП), в качестве которых использовали измельченные на планетарной шаровой мельнице осиновую древесину, сосновую (обесмоленную) древесину и багассу [18]. Концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 100 г/л, ФП добавляли из расчета 5 мг белка/г субстрата. Для наиболее полного проявления потенциала исследуемых ФП и повышения степени конверсии ВРБ в реакционную смесь также дополнительно добавляли рекомбинантный ФП  $\beta$ -глюкозидазы *P. verruculosum* F10 (40 ед./г субстрата). В качестве контрольного использовали ФП В1-537, полученный из реципиентного штамма рис. 3.

Осиновая древесина характеризуется высоким содержанием целлюлозы (40–55%) и гемицеллюлоз (ксиланов, до 40%), и относительно невысоким – лигнина (18–25%) [6] и, как уже отмечалось, для ее разрушения требуется высокая активность ФП ксиланазы. Действительно, наибольшим гидролитическим эффектом по отношению к измельченной осиновой древесине обладали ФП КСИЛА и КСИЛЗ (рис. 3а). За 2 сут наилучший из этих ФП (КСИЛЗ) приводил к образованию примерно 42 г/л ВС и 40 г/л глюкозы, контрольный ФП В1-537 в тех же условиях – 35 г/л ВС и 33 г/л глюкозы.

Состав багассы характеризуется меньшим содержанием целлюлозы, чем у древесных растений (~40%), в багассе много ксиланов (>30%) и относительно мало лигнина (не более 25%) [6]. Наибольшим гидролитическим эффектом в случае измельченной багассы обладал ФП КСИЛЗ, при использовании которого получали 42 г/л ВС и 32 г/л глюкозы, в то время как в контроле с ФП В1-537 – 32 г/л ВС и 27 г/л глюкозы (рис. 3б).

Древесина сосны содержит значительное количество целлюлозы (45–50%), до 30% гемицеллюлоз (в основном ксиланов), содержание лигнина составляет 25–35% [6]. Как и в случае ба-



**Рис. 3.** Выход ВС (1) и глюкозы (2) при конверсии различных видов растительного сырья (а – осина; б – сосна; в – багасса) под действием ферментных препаратов, обогащенных ксиланазой, через 48 ч после начала реакции. (Условия: ФП 5 мг белка/г субстрата в присутствии препарата  $\beta$ -глюкозидазы F10 (40 ед./г субстрата), [S] = 100 г/л, 50°C, pH 5.0, перемешивание – 250 об./мин).



гассы наилучшим для гидролиза измельченной обессмоленной сосновой древесины оказался ФП КСИЛ3, при использовании которого образовывалось 38 г/л ВС и 35 г/л глюкозы, при показателях в контроле с ФП В1-537 – 32 г/л ВС и 30 г/л глюкозы (рис. 3в).

\* \* \*

Таким образом, штамм *P. verruculosum* В1-537 (AniaD) был с успехом использован для получения продуцентов, синтезирующих вспомогательных по отношению к базовому целлюлазному комплексу ферментов, увеличивающих эффективность ФП: БГ, ПМО, а также КСИЛ.

С использованием “сильного” *cbh1* промотора были получены высокоактивные рекомбинантные продуценты вспомогательных ферментов, которые обеспечивали весьма высокое их содержание в ФП – до 80% БГ от общего белка и 24% ПМО. Однако в таких ФП уменьшалось содержание ферментов базового целлюлазного комплекса, в первую очередь ЦБГ1, что, вероятно, связано с титрованием положительных факторов транскрипции в рекомбинантных штаммах [30], поэтому общая литическая активность ФП с высоким содержанием вспомогательных ферментов по отношению к различным видам ВРБ уменьшалась. Эти ФП целесообразно использовать в составе смесей препаратов, основным компонентом которых являются ферменты базового целлюлазного комплекса, а ФП, содержащие вспомогательные ферменты, добавлены в относительно небольшом количестве.

Создание штаммов-продуцентов, позволяющих получить в результате однократно проведенного процесса культивирования сбалансированный комплекс, содержащий как базовые, так и вспомогательные ферменты для конверсии растительного сырья, было осуществлено при использовании “слабых” промоторов *gla1* и *hist4*. В результате были получены ФП, содержащие 13–14% БГ (*gla1* или *hist4*) и 9–10% ПМО (*gla1*). Кроме того, с помощью промотора *cbh1* были получены ФП, содержащие 17–18% КСИЛ. Во всех этих случаях в ФП не была нарушена целостность и сбалансированность базового целлюлазного комплекса.

Важным моментом в конструировании рекомбинантных промышленных штаммов была их стабильность при пересевах. Особенность рекомбинантных штаммов гриба *P. verruculosum* состоит в стабильной интеграции экзогенной ДНК в хромосому реципиентного штамма *P. verruculosum* В1-537 (AniaD), что не приводит к потере активности при пассировании штаммов. Это позволяет использовать полученные штаммы на производстве с воспроизводимыми результатами.

Использование экспрессионной системы на основе гриба *P. verruculosum* позволило увеличить

способность базового целлюлазного комплекса к конверсии различных видов ВРБ. Полученные с использованием этого штамма рекомбинантные ФП (или их смеси) не уступают или превосходят по эффективности действия большинство коммерческих ФП, специально созданных для промышленных процессов биоконверсии ВРБ.

Работа была выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 18-54-80027, а также Государственного задания АААА-А16-116052010081-5.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sánchez Ó.J., Cardona C.A. // Bioresour. Technol. 2008. V. 99. № 13 P. 5270–5295. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.013>
2. Ragauskas A.J., Williams C.K., Davison B.H., Britovsek G., Cairney J., Charles A. et al. // Science. 2006. V. 311. № 5760. P. 484–489. <https://doi.org/10.1126/science.1114736>
3. Carmen S. // Biotechnol. Adv. 2009. V. 27. № 2. P. 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
4. Menon V., Rao M. // Prog. Energy Combust. Sci. 2012. V. 38. № 4. P. 522–550. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>
5. Peralta-Yahya P.P., Keasling J.D. // Biotechnol. J. 2010. V. 5. № 2. P. 147–162. <https://doi.org/10.1002/biot.200900220>
6. Gan Q., Allen S.J., Taylor G. // Process Biochem. 2003. V. 38. № 7. P. 1003–1017. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00220-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00220-0)
7. Vassilev S.V., Baxter D., Andersen L.K., Vassileva C.G., Morgan T.J. // Fuel. 2012. V. 94. P. 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.09.030>
8. Чекушина А.В., Доценко Г.С., Сеницын А.П. // Катализ в промышленности. 2012. Т. 6. С. 68–76. (Chekushina A.V., Dotsenko G.S., Sinitsyn A.P. // Catal. Ind. 2012. V. 6. P. 68–76.)
9. Margeot A., Hahn-Hagerdal B., Edlund M., Slade R., Monot F. // Curr. Opin. Biotechnol. 2009. V. 20. № 3. P. 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.05.009>
10. Nieves R.A., Ehrman C.I., Adney W.S., Elander R.T., Himmel M.E. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 14. P. 301–304. <https://doi.org/10.1023/A:1008871205580>
11. Gusakov A.V. // Trends Biotechnol. 2011. V. 29. № 9. P. 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.004>
12. Kubicek C.P., Mikus M., Schuster A., Schmoll M., Seibot B. // Biotechnol. Biofuels. 2009. V. 2. P. 19–33. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-19>
13. Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H. // Microbiol. Molec. Biol. Rev. 2002. V. 66. № 3. P. 506–577. <https://doi.org/10.1128/mmbr.66.3.506-577.2002>
14. Berlin A., Gilkes N., Kilburn D., Maximenko V., Bura R., Markov A. et al. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2006. V. 129–132. P. 528–545. <https://doi.org/10.1385/abab:130:1:528>
15. Гусаков А.В., Сеницын А.П. Химия биомассы: биотоплива и биопластики. / Ред. С.Д. Варфаломеев. М.: Научный мир, 2017. С. 65–99.

16. Синецыйн А.П., Окунев О.Н., Черноглазов В.М., Синецыйна О.А., Черноглазов В.М. Патент РФ. 2361918. 2009.
17. Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravitnikov A., Osipov D., Sinityn A. // *Biotechnol. J.* 2010. V. 5. № 8. P. 871–880. <https://doi.org/10.1002/biot.201000050>
18. Синецыйн А.П., Осипов Д.О., Рожкова А.М., Бушина Е.В., Доценко Г.С., Синецыйна О.А. и др. // *Биотехнология.* 2013. Т. 29. № 5. С. 40–53. doi (Sinityn A.P., Osipov D.O., Rozhkova A.M., Bushina E.V., Dotsenko G.S., Sinityna O.A. et al. // *Biotechnology (Russia).* 2013. V. 29. № 5. P. 40–53.) <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2013-5-40-53>
19. Skomarovsky A.A., Gusakov A.V., Okunev O.N., Solov'eva I.V., Bubnova T.V., Kondrat'eva E.G. et al. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2005. V. 41. P. 182–184. <https://doi.org/10.1007/s10438-005-0032-6>
20. Синецыйн А.П., Рожкова А.М., Синецыйна О.А., Федорова Е.А., Окунев О.Н., Беккаревич А.О. и др. Патент РФ 2378372. 2009.
21. Короткова О.Г., Семенова М.В., Морозова В.В., Зоров И.Н., Соколова Л.М., Бубнова Т.М. и др. // *Биохимия.* 2009. Т. 74. № 5. С. 699–709. (Korotkova O.G., Semenova M.V., Morozova V.V., Zorov I.N., Sokolova L.M., Bubnova T.M. et al. // *Biochemistry (Moscow).* 2009. V. 74. № 5. P. 569–577.)
22. Синецыйн А.П., Скомаровский А.А., Чекушина А.В., Синецыйна О.А., Немашкалов В.А., Кондратьева Е.Г. и др. // *Катализ в промышленности.* 2015. Т. 15. № 5. С. 74–77. doi (Sinityn A.P., Skomarovskiy A.A., Chekushina A.V., Sinityna O.A., Nemashkalov V.A., Kondratieva E.G. et al. // *Catal. Ind.* 2015. V. 15. № 5. P. 74–77.) <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2015-5-74-77>
23. Короткова О.Г., Рожкова А.М., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Немашкалов В.А. и др. // *Катализ в промышленности.* 2011. № 5. С. 61–68. (Korotkova O.G., Rozhkova A.M., Matys V.Yu., Koshelev A.V., Okunev O.N., Nemashkalov V.A. et al. // *Catal. Ind.* 2011. № 5. P. 61–68.)
- shelev A.V., Okunev O.N., Nemashkalov V.A. et al. // *Catal. Ind.* 2011. № 5. P. 61–68.)
24. Dotsenko G.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Korotkova O.G., Sinityn A.P. // *Process Biochem.* 2015. V. 50. № 8. P. 1258–1263. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.008>
25. Булахов А.Г., Гусаков А.В., Чекушина А.В., Сампудинов А.Д., Кошелев А.В., Матыс В.Ю. и др. // *Биохимия.* 2016. Т. 81. № 5. С. 701–709. doi (Bulakhov A.G., Gusakov A.V., Chekushina A.V., Satrudinov A.D., Koshelev A.V., Matys V.Yu. et al. // *Biochemistry (Moscow).* 2016. V. 81. № 5. P. 530–537.) <https://doi.org/10.1134/S0006297916050102>
26. Bulakhov A.G., Volkov P.V., Rozhkova A.M., Gusakov I.A.V., Nemashkalov V.A., Satrudinov I.A.D. et al. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170404>
27. Проскураина О.В., Короткова О.Г., Рожкова А.М., Кондратьева Е.Г., Матыс В.Ю., Зоров И.Н. и др. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2015. Т. 51. № 6. С. 592–599. doi (Proskurina O.V., Korotkova O.G., Rozhkova A.M., Kondratieva E.G., Matys V.Yu., Zorov I.N. et al. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2015. V. 51. № 6. С. 667–673.) <https://doi.org/10.7868/S0555109915060124>
28. Proskurina O.V., Korotkova O.G., Rozhkova A.M., Matys V.Yu., Koshelev A.V., Okunev O.N. et al. // *Catal. Ind.* 2014. V. 6. № 1. P. 72–78. <https://doi.org/10.1134/S2070050414010085>
29. Осипов Д.О., Рожкова А.М., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Рубцова Е.А. и др. // *Катализ в промышленности.* 2010. № 5. С. 63–70. (Osipov D.O., Rozhkov A.M., Matys V.Yu., Koshelev A.V., Okunev O.N., Rubtsova E.A. et al. // *Catal. Ind.* 2010. № 5. P. 63–70.)
30. Чулкин А.М., Кислицин В.Ю., Зоров И.Н., Синецыйн А.П., Рожкова А.М. // *Биотехнология.* 2019. Т. 35. № 5. С. 51–57. doi (Chulkin A.M., Kislytsyn V.Yu., Zorov I.N., Sinityn A.P., Rozhkova A.M. // *Biotechnology (Russia).* 2019. V. 35. № 5. P. 51–57.) <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-5-51-57>

## Capabilities of the Fungus *Penicillium verruculosum* Expression System for Producing of Enzymes Providing Effective Destruction of Renewable Plant Biomass (Review)

A. P. Sinityn<sup>a, b</sup>, O. A. Sinityna<sup>b</sup>, I. N. Zorov<sup>a, b</sup>, and A. M. Rozhkova<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup>Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>b</sup>Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: amrojkova@yahoo.com

The review systematizes the data on the use of the *Penicillium verruculosum* B1-537 ( $\Delta$ niaD) recipient strain to produce supporting enzymes to the endogenous cellulase complex, increasing its effectiveness –  $\beta$ -glucosidase, polysaccharide monoxygenase, as well as xylanases. A feature of the *P. verruculosum* strain is the secretion of the basic complex of cellulases, consisting of cellobiohydrolases and endoglucanases, which in their hydrolytic ability exceed the most widely used strains of *Hypocrea (Trichoderma)* in laboratory and industrial practice. Using the capabilities of the *P. verruculosum* B1-537 expression system ( $\Delta$ niaD), it is possible to introduce new enzymes into the endogenous cellulase complex necessary to increase its total hydrolytic activity, and to create enzyme preparations adapted for the conversion of various types of renewable plant biomass (RPB). The use of the expression system based on the *P. verruculosum* fungus made it possible to increase the ability of the base cellulase complex to convert various types of RPB.

**Keywords:** expression system, cellulases, hemicellulases, renewable plant biomass, *Penicillium verruculosum*