

УДК 577.15

НОВЫЙ ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ, СОДЕРЖАЩИЙ ПОЛИСАХАРИДМОНООКСИГЕНАЗУ И β -ГЛЮКОЗИДАЗУ – СИНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ДОБАВКИ К ЦЕЛЛЮЛАЗАМ

© 2022 г. М. В. Семенова^{1, *}, А. В. Гусаков², В. Д. Телицин², В. Ю. Матыс³, Т. В. Бубнова³, В. А. Немашкалов³, А. М. Рожкова¹, А. П. Сеницын^{1, 2}

¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушино, 142290 Россия

*e-mail: margis@mail.ru

Поступила в редакцию 11.02.2022 г.

После доработки 18.02.2022 г.

Принята к публикации 28.02.2022 г.

На основе реципиентного штамма *Penicillium verruculosum* B1-537 (Δ niaD) с использованием промотора гена целлюбиогидролазы I создан продуцент гомологичной литической полисахаридмонооксигеназы (ПМО) и гетерологичной β -глюкозидазы *Aspergillus niger* (БГ) – вспомогательных ферментов для “базового” целлюлазного комплекса, состоящего из эндоглюканаз и целлюбиогидролаз. Получен ферментный препарат ПМО-БГ, содержащий 34% ПМО и 43% БГ, который был использован в качестве источника вспомогательных ферментов, увеличивающих на 20–100% эффективность действия базовых целлюлаз *P. verruculosum* при биоконверсии различных видов целлюлозосодержащего сырья: микрокристаллической целлюлозы, предобработанного щелочью тростника и полубеленой сульфатной лиственной целлюлозы АО “Архангельский ЦБК”.

Ключевые слова: полисахаридмонооксигеназа, β -глюкозидаза, целлюлазы, синергизм, биоконверсия

DOI: 10.31857/S0555109922040146

Основную часть органического материала на Земле составляет возобновляемая растительная биомасса, одним из компонентов которой является целлюлоза. Ферментативный гидролиз целлюлозы осуществляется комплексом “базовых” целлюлаз – целлюбиогидролаз (ЦБГ) и эндоглюканаз (ЭГ), осуществляющих гидролиз до глюкозы, целлобиозы и целлоолигосахаридов. К вспомогательным ферментам, усиливающим действие целлюлаз, относятся β -глюкозидазы (БГ), гидролизующие целлобиозу и целлоолигосахариды до глюкозы, а также литические полисахаридмонооксигеназы (ПМО), катализирующие окислительную деструкцию основных цепей целлюлозы, способствующую аморфизации ее кристаллических зон.

Целлюлолитические грибы родов *Hypocrea* (*Trichoderma*) и *Penicillium* наиболее часто используются в качестве источника ферментов для биоконверсии лигноцеллюлозных материалов (ЛЦМ) [1–5]. Для ферментных комплексов, продуцируемых этими грибами, характерна несбалансированность по составу между “базовыми” целлюлазами и вспомогательными ферментами. Для решения этой проблемы предложено, например, вводить дополнительно к “базовым” целлюлазам 5–10% ферментного препарата (ФП), содер-

жащего БГ и/или ПМО [6, 7]. Другой подход подразумевает встройку в геном грибов генов, кодирующих гомологичные или гетерологичные БГ или ПМО [8–10]. ФП, полученные из продуцентов в результате гетерологичной экспрессии гена БГ *Aspergillus niger* (*bglI*) или гена ПМО *Trichoderma reesei* (*lpmo*) в штамме-реципиенте *P. verruculosum*, продемонстрировали синергетическое увеличение эффективности действия целлюлазного комплекса *P. verruculosum* при ферментативном гидролизе различных видов ЛЦМ [9, 11–14].

Цель работы – осуществление одновременной экспрессии генов *lpmo* и *bglI* в реципиентном штамме *P. verruculosum* B1-537 (Δ niaD) для создания продуцента *P. verruculosum* ПМО-БГ, получение на его основе нового ФП с активностями как ПМО, так и БГ и его использование вместе с “базовыми” целлюлазами *P. verruculosum* B1-537 при гидролизе ЛЦМ.

МЕТОДИКА

Штаммы и ферментные препараты. В работе были использованы штаммы: *P. verruculosum* B1-537 (Δ niaD) (реципиентный штамм – проду-

цент “базовых” целлюлаз [15, 16]), *P. verruculosum* ПМО-БГ (продуцент ПМО и БГ), *P. verruculosum* ПМО (продуцент ПМО [17]) и *P. verruculosum* F10 (продуцент БГ [6]).

Для получения комплексного ферментного препарата, содержащего ПМО и БГ, реципиентный штамм *P. verruculosum* 537 ($\Delta niaD$) был трансформирован плазмидами рСВН1-BGL [6] и рСВН1-РМО [17], полученными ранее. Трансформированные протопласты высевали на селекционную среду с 10 мМ нитрата натрия. В качестве котрансформационной плазмиды, обеспечивающей прототрофность рекомбинантных штаммов после трансформации, была взята плазмида рСТА10, несущая ген *niaD*, кодирующий нитратредуктазу *A. niger*. Для трансформации использовался протокол трансформации для *P. canescens* с модификациями для штамма *P. verruculosum* [18]. Соотношение плазмид рСВН1-BGL, рСВН1-РМО и рСТА10 было 3 : 3 : 1 (мкг/мкл). Частота событий одновременной трансформации реципиентного штамма двумя плазмидами составляла 15 трансформантов на 1 мкг смеси экзогенных ДНК. Наличие интегративной вставки гетерологического гена *bgl1 A. niger* в рекомбинантах доказывалось методом ПЦР с использованием Phire-полимеразы (“ThermoFisher Scientific”, США). Размер гена *bgl1* составлял ~2950 п.о. Наличие одновременной сверхэкспрессии гомологичной ПМО и гетерологичной БГ доказывалось электрофоретически по увеличению интенсивности полос белка в районе 35 и 120 кДа соответственно, с последующим масс-спектрометрическим анализом трипсиновых гидролизатов белков на приборе Ultraflex Xtreme II (“Bruker Daltonics”, Германия). Пептидные фрагменты анализировали с использованием MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), а также сервисов PeptideMass и FindPept (<http://expasy.org/tools/>).

Штаммы *P. verruculosum* выращивали в качалочных колбах Эрленмейера емкостью 750 мл в 100 мл ферментационной среды следующего состава (%): KH_2PO_4 – 1.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.03, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.03, глюкоза – 1.0, дрожжевой экстракт – 1.0, пшеничные отруби – 1.0, микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) – 40.0. После культивирования в течение 144 ч на качалке при 220 об./мин и 30°C культуральную жидкость (КЖ) отделяли от мицелия центрифугированием в течение 10 мин при 10700 g.

Ферментные препараты В1-537, ПМО-БГ, ПМО и БГ были получены путем лиофильного высушивания КЖ штаммов *P. verruculosum* В1-537 ($\Delta niaD$), *P. verruculosum* ПМО-БГ, *P. verruculosum* ПМО и *P. verruculosum* F10 на лиофильной сушке Benchtop 6K ES (“SP Scientific/Virtis”, США).

Реагенты. Для создания буферных смесей использовали реактивы фирм “Bio-Rad” (США),

“Panreac” (Германия), “Helicon” и “Реахим” (Россия).

При ферментативном гидролизе ЛЦМ в качестве субстратов использовали: МКЦ (ТУ 20.16.59-001-40693384-209, “Кристалл”, Россия); тростник обыкновенный из Астраханской обл., дезинтегрированный, обработанный 1.5%-ным NaOH при 120°C в течение 1 ч с последующей нейтрализацией и многократной отмывкой дистиллированной водой; полубеленую сульфатную лиственную целлюлозу (“Архангельский ЦБК”, Россия).

Для определения активностей ФП в качестве субстратов использовали МКЦ, ксилан из бука, Na-соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), *n*-нитрофенил- β -глюкозид (*n*НФГ) (все производства “Sigma”, США), 2,6-диметоксифенол (2,6-ДМФ, “Thermo Fisher Scientific Inc.”, США), пероксид водорода 3%-ный (“Тульская фармацевтическая фабрика”, Россия).

Определение активностей ФП. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль продукта за 1 мин.

Активности по отношению к полисахаридным субстратам (концентрация 5 г/л в реакционной смеси) определяли по начальным скоростям образования восстанавливающих сахаров (ВС) при pH 5.0 и 50°C методом Шомоди–Нельсона [19].

Активности по отношению к *n*НФГ (0.9 мМ в реакционной смеси) определяли по скорости образования *n*-нитрофенола при pH 5.0 и 50°C [19].

Активность ПМО с использованием 2,6-ДМФ в качестве модельного субстрата и H_2O_2 в качестве ко-субстрата определяли при pH 7.5 и 30°C согласно методике, описанной в работе [20]. Концентрацию хромогенного продукта рассчитывали, используя коэффициент экстинкции $53200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Содержание белка в ФП определяли методом Лоури, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Электрофорез в 12%-ном ПААГ с Na-ДДС (ЭФ-ПААГ) проводили на приборе MiniProtein (“Bio-Rad”, США) согласно руководству к прибору. Содержание отдельных белков в ФП оценивалось методом денситометрии.

Анализ состава ФП. Анализ компонентного состава ФП проводили в соответствии с методикой, приведенной в работе [21]. На первой стадии проводили хроматографическое фракционирование ФП с использованием анионообменного носителя Source 15Q. Для каждой фракции проводили ЭФ-ПААГ, а также определяли активности по отношению к разным субстратам и содержание белка. Ферментный состав каждой фракции идентифицировали на основе измерения активностей и масс-спектрометрического анализа трипсиновых гидролизатов соответствующих белковых полос,

Таблица 1. Активности ферментов в используемых ФП (ед./г белка)

ФП	Субстрат				
	<i>n</i> НФГ	2,6-ДМФ	МКЦ	КМЦ	ксилан
ПМО-БГ	31 800 ± 700	41 ± 3	310 ± 20	2950 ± 250	2790 ± 200
БГ	61 100 ± 900	0	400 ± 30	3390 ± 300	3310 ± 280
ПМО	500 ± 10	73 ± 6	450 ± 40	3370 ± 290	8700 ± 710
В1-537	1800 ± 80	0	860 ± 70	13000 ± 900	19800 ± 950

полученных с помощью ЭФ-ПААГ [22]. Для определения содержания индивидуальных ферментов в составе ФП использовали метод денситометрии, оценивая долю фермента во фракции на основе интенсивности его полосы в электрофоретическом геле. Затем, зная содержание белка в этой фракции и долю фермента, рассчитывали его содержание в исходном препарате.

Биоконверсия ЛЦМ. Биоконверсию ЛЦМ проводили при концентрации “базового” целлюлазного ФП, полученного с помощью штамма *P. verruculosum* В1-537, 1 г/л (по белку), что соответствовало дозировке 10 мг белка/г субстрата. В реакционную смесь вносили дополнительно 0, 10 или 20% ФП ПМО-БГ, или ПМО, или БГ из расчета 0, 1 или 2 мг белка/г субстрата.

Гидролиз проводили в пластиковых пробирках объемом 2 мл (объем реакционной смеси 1.5 мл) в термостатируемом шейкере Biosan TS-100 (“Biosan”, Латвия) в присутствии 0.1 г/л антибиотика ампиокса при pH 5.0 и 40°C. Концентрация субстрата составляла 100 г/л в пересчете на сухое вещество.

В ходе процесса отбирали аликвоты, в которых определяли концентрацию ВС методом Шомоды–Нельсона и глюкозы, используя набор “Фотоглюкоза” и инструкцию к нему (“Импакт”, Россия). Качественный и количественный состав низкомолекулярных сахаров определяли с помощью ВЭЖХ-системы Agilent 1100 (“Agilent”, США) на колонке Диасфер-110-Амин (5 мкм, 4.0 × 250 мм). В качестве элюента использовали смесь ацетонитрил-вода 75 : 25 при скорости элюции 1 мл/мин, объем анализируемого образца 10–100 мкл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Активность и состав используемых ФП. Для используемых в работе ФП были измерены активности по отношению к ряду субстратов (табл. 1). ФП ПМО-БГ и БГ обладали высокой β-глюкозидазной активностью (по отношению к *n*НФГ) – 31 800 и 61 100 ед./г белка, β-глюкозидазная активность ФП В1-537 и ПМО была низкой.

Активность полисахаридмонооксигеназы у ФП ПМО-БГ и ПМО по отношению к 2,6-ДМФ

составила 41 и 73 ед./г белка, у ФП, полученного с помощью штаммов В1-537 и БГ, отсутствовала. Относительно низкое значение активности ФП ПМО-БГ и ПМО по 2,6-ДМФ объяснялась невысокими каталитическими константами по отношению к этому субстрату, характерными для всех ПМО. Так, активность очищенной ПМО из *Neurospora crassa*, определенная по этой же методике, составляла 32 ед./г [20].

КМЦазная (эндоглюканазная) активность препаратов ПМО-БГ, БГ и ПМО была приблизительно одинаковой (около 3000 ед./г белка), у ФП В1-537 активность по КМЦ была выше и составляла 13000 ед./г белка.

Активность по МКЦ (целлобиогидролазная активность), возрастала от 310 до 850 ед./г в ряду ФП ПМО-БГ, БГ, ПМО и В1-537.

Активность ксиланазы ФП ПМО-БГ и БГ составляла около 3000 ед./г белка, у ФП ПМО и В1-537 ксиланаза была выше – 8700 и 19 800 ед./г белка соответственно.

На рис. 1 представлен данные ЭФ-ПААГ для ФП ПМО-БГ, а также для ФП реципиентного штамма В1-537. На электрофореграмме ПМО-БГ присутствуют две мажорные полосы около 120 и 33 кДа, соответствующие БГ и ПМО. Для ФП В1-537 характерен белковый кластер ЦБГ I и ЦБГ II в диапазоне 50–65 кДа (общее содержание всех ЦБГ составляло около 60%) и несколько белковых полос в диапазоне 35–50 кДа, соответствующих ЭГ I и ЭГ II (общее содержание всех ЭГ около 15%). Эти белки или отсутствуют в ФП ПМО-БГ, или их содержание снижено в несколько раз (табл. 2).

Содержание ферментов в ФП ПМО-БГ, определенное с помощью хроматографического фракционирования, составило 34% (ПМО) и 43% (БГ) от общего количества белка, препарат также содержал небольшое количество ЦБГ (15%) и ЭГ (5%). Согласно литературным данным [23, 24], для проявления синергетического эффекта между целлюлазами и вспомогательными ферментами, достаточно небольшого количества последних (около 10% каждого), поэтому с точки зрения состава вспомогательных ферментов новый ФП перспективен в качестве добавки к “базовому” целлюлазному комплексу.

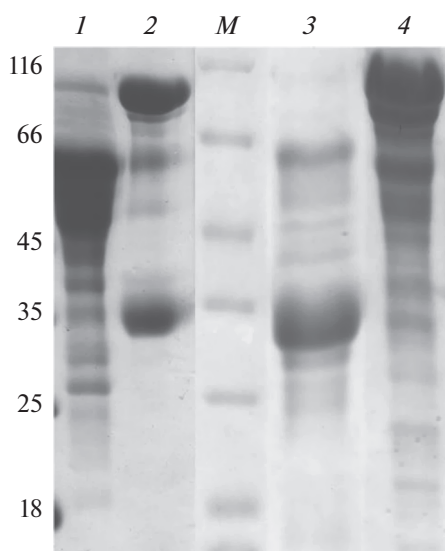


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ с Na-ДДС. ФП: 1 – В1-537, 2 – ПМО-БГ, 3 – ПМО, 4 – БГ. М-маркеры, указаны молекулярные массы стандартных белков.

Используемые в работе ФП БГ содержал около 80% β-глюкозидазы [6], ФП ПМО имел в своем составе около 70% ПМО [16] (табл. 2).

Биоконверсия ЛЦМ. Для биоконверсии были использованы следующие материалы: МКЦ, тростник обыкновенный и полубеленая сульфатная листовая целлюлоза. Для увеличения реакционной способности тростник был подвергнут щелочной предобработке по методике [25, 26]. МКЦ и полубеленая целлюлоза какой-либо дополнительной обработке не подвергались, так как обладали достаточно высокой реакционной способностью [27].

В качестве источника “базовых” целлюлаз (ЦБГ и ЭГ) для гидролиза ЛЦМ использовали ФП В1-537, в качестве источника одновременно БГ и ПМО – ФП ПМО-БГ, в качестве источника только БГ – ФП БГ, только ПМО – ФП ПМО (форезы последних двух ФП также представлены на рис. 1).

После 48 ч гидролиза МКЦ (рис. 2а) под действием базового ФП В1-537, внесенного из расчета 10 мг белка/г субстрата, концентрация глюкозы и ВС в реакционной смеси составила 14 и 19 г/л соответственно (исходная концентрация МКЦ была 100 г/л). Полученные результаты свидетельствовали об относительно низкой степени конверсии субстрата под действием “базового” целлюлазного комплекса, а также об образовании в качестве продуктов гидролиза целлоолигосахаридов помимо глюкозы, что было подтверждено данными ВЭЖХ-анализа (данные не приведены).

При внесении в реакционную смесь дополнительно к препарату В1-537 10% ФП ПМО-БГ (1 мг белка/г субстрата) концентрация глюкозы и ВС через 48 ч гидролиза увеличилась до 26 и 27 г/л со-

ответственно. Вклад ФП ПМО-БГ составил 2 г/л глюкозы и 3 г/л ВС при использовании этого ФП в дозировке 1 мг белка/г субстрата. Таким образом, внесение в реакционную смесь относительно небольшого количества вспомогательного ФП ПМО-БГ привело к увеличению эффективности действия базового ФП В1-537 на 60% по выходу глюкозы и 30% по выходу ВС.

Увеличение концентрации ФП ПМО-БГ до 20% в реакционной смеси (до 2 мг белка/г субстрата) не привело к существенному увеличению выхода продуктов.

При использовании в качестве вспомогательного только ФП БГ (10%, 1 мг белка/г субстрата) привело к увеличению выхода глюкозы и ВС после 48 ч гидролиза до 24 и 25 г/л, т.е. эффективность действия ФП В1-537 увеличилась на 59% по выходу глюкозы и 20% по выходу ВС. Увеличение концентрации ФП БГ до 20% (2 мг белка/г субстрата) не приводило к существенному увеличению выхода продуктов. Вклад ФП БГ составил 1.6 или 2.9 г/л глюкозы и 1.9 или 4.6 г/л ВС при внесении 1 или 2 мг белка/г субстрата соответственно.

Таблица 2. Содержание основных ферментов (%) в используемых ФП

ФП	Фермент, %				
	БГ*	ПМО	ЦБГ	ЭГ	ксиланаза
ПМО-БГ	43	34	15	5	2
БГ	80	0	10	5	2
ПМО	2	70	25	7	2
В1-537	3	0	60	15	3

* Указано содержание собственной и/или клонированной БГ.

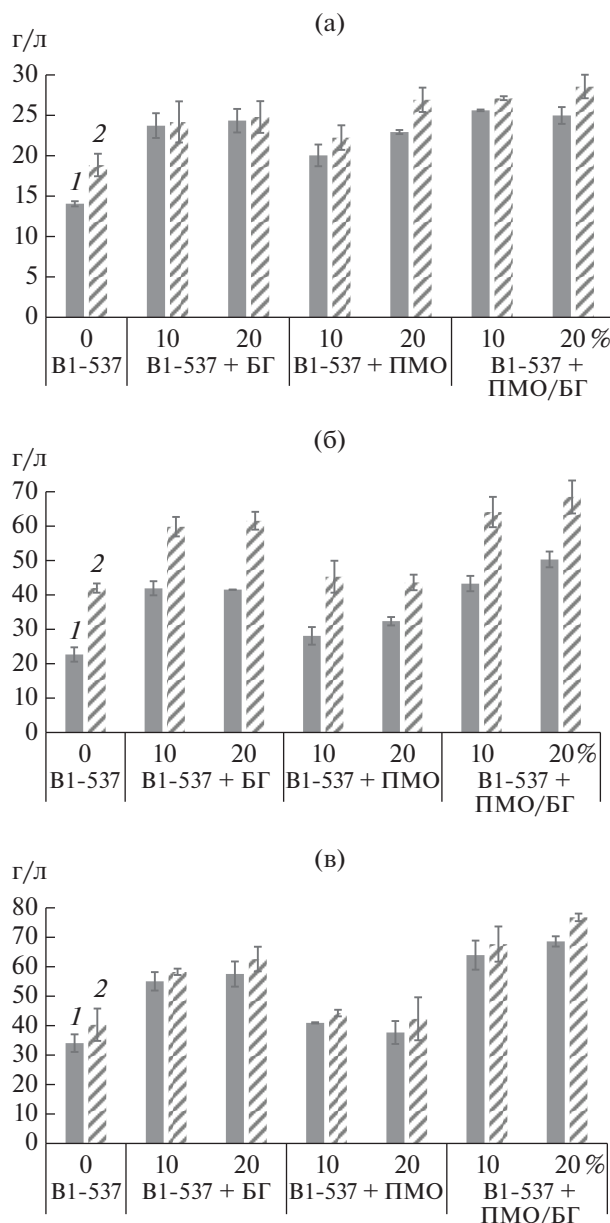


Рис. 2. Концентрация глюкозы (1) и ВС (2) после 48 ч гидролиза МКЦ (а), предобработанного тростника (б) и полуоблепённой сульфатной лиственничной целлюлозы (в) в присутствии базового ФП В1-537 (10 мг белка/г субстрата или 1 г белка/л в реакционной смеси), а также при добавлении к нему 10 или 20% ФП БГ, ПМО или ПМО-БГ.

В случае использования в качестве вспомогательного только ФП ПМО было отмечено преимущество смеси ФП В1-537 с 20% ПМО, которая обеспечивала выход глюкозы и ВС до 23 и 27 г/л, эффективность действия ФП В1-537 увеличивалась на 42% по выходу глюкозы и на 18% по выходу ВС. Вклад ФП ПМО составил 2.2 или 3.0 г/л глюкозы и 2.8 или 4.6 г/л ВС при внесении в реакционную смесь 1 или 2 мг белка/г субстрата соответственно.

Таким образом, при гидролизе МКЦ предпочтительным источником вспомогательных ферментов оказался ФП ПМО-БГ: 10%-ной добавки

ФП ПМО-БГ оказалось достаточно для максимально возможного в условиях эксперимента увеличения эффективности базового ФП В1-537 до 60% по выходу глюкозы и до 30% по выходу ВС.

После 48 ч гидролиза предобработанного тростника (рис. 2б) базовым ФП В1-537 (10 мг белка/г субстрата) концентрация глюкозы и ВС в реакционной смеси составляла 23 и 42 г/л соответственно. Полученные результаты свидетельствовали об образовании помимо глюкозы в качестве продуктов гидролиза целлоолигосахаридов, а также продуктов гидролиза гемицеллюлоз. ВЭЖХ-анализ гидролизата показал присутствие ксилозы (3 г/л), араби-

нозы (1 г/л) и целлоолигосахаров (преимущественно целлобиозы) суммарно около 5 г/л.

При внесении в реакционную смесь 10% вспомогательного ФП ПМО-БГ концентрации глюкозы и ВС после 48 ч гидролиза составили 43 и 64 г/л соответственно, а при внесении 20% ПМО-БГ – 50 и 68 г/л. Увеличение эффективности действия базового ФП В1-537 составило 80 и 100% для выхода глюкозы (при дополнительных 10 и 20% ФП ПМО-БГ) и 40% – для выхода ВС. Вклад ФП ПМО-БГ составил 1.0 или 1.6 г/л глюкозы и 3.5 или 7.0 г/л ВС при внесении 1 или 2 мг белка/г субстрата соответственно.

Использование в качестве вспомогательного только ФП БГ привело к увеличению концентрации глюкозы и ВС после 48 ч гидролиза до 42 и 60–62 г/л (при внесении 10 и 20% ФП БГ соответственно), т.е. эффективность действия ФП В1-537 увеличивалась на 78 и 70% по выходу глюкозы и на 27 и 22% по выходу ВС. Вклад ФП БГ составил 1.6 или 3.3 г/л глюкозы и 6.7 или 10.3 г/л ВС при внесении 1 или 2 мг белка/г субстрата соответственно.

Использование только ФП ПМО в качестве вспомогательного при гидролизе тростника было мало эффективным и не давало значимого увеличения выхода глюкозы относительно действия только одного ФП В1-537.

Таким образом, при гидролизе предобработанного тростника эффективность ФП ПМО-БГ как источника вспомогательных ферментов относительно ФП БГ и ФП ПМО была очевидной. Использование ФП ПМО-БГ приводило к увеличению до 100% по выходу глюкозы и до 40% по выходу ВС.

После 48 ч гидролиза полубеленой сульфатной лиственной целлюлозы (рис. 2в) под действием индивидуального базового ФП В1-537 (10 мг белка/г субстрата) концентрация глюкозы и ВС в реакционной смеси составила 34 и 40 г/л соответственно. По данным ВЭЖХ помимо глюкозы в качестве продуктов образуются ксилоза (4 г/л) и целлоолигосахариды (преимущественно целлобиоза, около 2 г/л).

При внесении в реакционную смесь 10% вспомогательного ПМО-БГ концентрация глюкозы и ВС после 48 ч гидролиза составили 64 и 68 г/л соответственно, а при внесении 20% ПМО-БГ – 69 и 77 г/л. Увеличение эффективности действия базового ФП В1-537 составило 80% по выходу глюкозы и 50 и 70% по выходу ВС при внесении дополнительных 10 и 20% ФП ПМО-БГ соответственно. Вклад ФП ПМО-БГ составил 2.2 или 4.0 г/л глюкозы и 3.4 или 6.1 г/л ВС при концентрации 1 или 2 мг белка/г субстрата.

Использование в качестве вспомогательного только ФП БГ привело к увеличению концентрации глюкозы и ВС после 48 ч гидролиза до 55–57

и 58–63 г/л соответственно (при внесении 10 или 20% ФП БГ), то есть эффективность действия ФП В1-537 увеличилась на 81–90 или 34–37% по выходу глюкозы и ВС соответственно. Вклад ФП БГ составил 3.0 или 4.9 г/л глюкозы и 4.5 или 7.6 г/л ВС при концентрации 1 или 2 мг белка/г субстрата.

Использование 10–20% вспомогательного ФП ПМО при гидролизе полубеленой целлюлозы было мало эффективным и давало лишь небольшое увеличение выхода глюкозы относительно базового ФП В1-537.

Таким образом, так же как и в случае предобработанного тростника, при конверсии полубеленой сульфатной лиственной целлюлозы эффективность ФП ПМО-БГ как источника вспомогательных ферментов относительно ФП БГ и ФП ПМО очевидна. Использование ФП ПМО-БГ приводило к увеличению выхода глюкозы до 50% и выхода ВС до 30%.

Результаты биоконверсии ЛЦМ зависят от сбалансированности состава гидролитического комплекса, состоящего из экзо- и эндополимераз (ЦБГ и ЭГ), а также присутствия в реакционной смеси вспомогательных ферментов (БГ и ПМО). Принято считать, что доля вспомогательных ферментов должна составлять около 10% каждого от общего пула ферментов “базового” целлюлазного комплекса [6, 7, 23, 24]. В настоящей работе показано, что уже добавление 10% (по белку) ФП ПМО-БГ, содержащего одновременно БГ и ПМО примерно в равных соотношениях, существенно увеличивало эффективность гидролиза МКЦ, предобработанного тростника и полубеленой целлюлозы под действием базового целлюлазного комплекса *P. verruculosum*, причем ФП ПМО-БГ превосходил по эффективности ФП, содержащие только БГ или ПМО.

В работе [7] замена 10% целлюлаз на эквивалентное количество ПМО из *T. reesei*, *Myceliophthora thermophila* или *Thielavia terrestris* приводила к увеличению выхода ВС на 17–18% при гидролизе МКЦ. Смесь “базового” целлюлазного комплекса *P. verruculosum* с гомогенными ПМО *T. reesei* и БГ *A. niger* давала увеличение выхода глюкозы на 100% при гидролизе МКЦ, при этом основной синергетический эффект наблюдался при добавлении к целлюлазам БГ, а вклад ПМО составлял лишь 5% [28]. В работах [6, 11] добавление ФП, содержащего преимущественно БГ, к “базовому” целлюлазному комплексу *P. verruculosum* увеличивало выход продуктов гидролиза измельченной осиновой древесины и пергамента на 80 и 43% соответственно. В настоящей работе добавление ФП ПМО-БГ к “базовому” целлюлазному комплексу *P. verruculosum* было наиболее

эффективно при гидролизе предобработанного тростника и полубеленой сульфатной листовенной целлюлозы и это обеспечивало увеличение выхода глюкозы на 80–100%.

Полученные результаты позволяют рекомендовать новый ФП ПМО-БГ как источник дополнительных ферментов для интенсификации процесса биоконверсии ЛЦМ.

Работа была выполнена в рамках ГЗ НИР МГУ АААА-А21-121011290089-4.

Авторы благодарят сотрудников ЦКП “Промышленные биотехнологии” ФИЦ Биотехнологии РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nieves R.A., Ehrman C.I., Adney W.S. et al. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 14. P. 301–304. <https://doi.org/10.1023/A:1008871205580>
2. Gusakov A.V. // Trends Biotechnol. 2011. V. 29. № 9. P. 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.004>
3. Чекушина А.В., Доценко Г.С., Сеницын А.П. // Катализ в промышленности. 2012. Т. 6. С. 68–76.
4. Kubicek C.P., Mikus M., Schuster A. et al. // Biotechnol. Biofuels. 2009. V. 2. P. 19–33. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-19>
5. Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. // Microbiol. Molec. Biol. Rev. 2002. V. 66. № 3. P. 506–577. <https://doi.org/10.1128/mmbr.66.3.506-577.2002>
6. Dotsenko G.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Korotkova O.G., Sinitsyn A.P. // Process Biochem. 2015. V. 50. P. 1258–1263.
7. Булахов А.Г., Гусаков А.В., Чекушина А.В., Самрадинов А.Д., Кошелев А.В., Матыс В.Ю., Сеницын А.П. // Биохимия. 2016. Т. 81. № 5. С. 701–709.
8. Чекушина А.В., Доценко Г.С., Кондратьева Е.Г., Сеницын А.П. // Биотехнология. 2013. Т. 3. С. 58–68.
9. Сеницын А.П., Короткова О.Г., Сеницына О.А., Рожкова А.М., Доценко Г.С., Проскура О.В., Осипов Д.О., Кондратьева Е.Г., Чекушина А.В. // Биокатализ. 2015. Т. 15. № 6. С. 78–83. <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2015-6-78-83>
10. Bulakhov A.G., Volkov P.V., Rozhkova A.M., Gusakov A.V., Nemashkalov V.A., Sinitsyn A.P. // PLoS ONE. 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170404>
11. Сеницын А.П., Скомаровский А.А., Чекушина А.В., Сеницына О.А., Немашкалов В.А., Кондратьева Е.Г., Рожкова А.М., Кошелев А.В. // Биокатализ. 2015. Т. 15. № 5. С. 74–77. <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2015-5-74-77>
12. Сеницын А.П., Сеницына О.А., Зоров И.Н., Рожкова А.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 65. С. 551–560. <https://doi.org/10.31857/S0555109920060161>
13. Семенова М.В., Гусаков А.В., Телицын В.Д., Сеницын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 5. С. 477–484. <https://doi.org/10.31857/S0555109921050147>
14. Короткова О.Г., Семенова М.В., Морозова В.В., Зоров И.Н., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Сеницын А.П. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 5. С. 699–709.
15. Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M. et al. // Biotechnol. J. 2010. V. 5. № 8. P. 871–880. <https://doi.org/10.1002/biot.201000050>
16. Сеницын А.П., Сеницына О.А., Рожкова А.М. // Биотехнол. 2021. Т. 36. №6. С. 24–41. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-6-24-41>
17. Semenova M.V., Gusakov A.V., Volkov P.V., Matys V.Y., Nemashkalov V.A., Telitsin V.D., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. // Mol. Biol. Rep. 2019. V. 46. P. 2363–2370. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04693-y>
18. Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V., Clutterbuck A.J. // Current Genetics. 1995. V. 28. P. 474–478.
19. Сеницын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. // Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ, Биотехнология. 1990. № 25. С. 148.
20. Breslmayr E., Hanzek M., Hanrahan A., Leitner C., Kittl R., Santek B., Oostenbrink C., Ludwig R. // Biotechnol. Biofuels. 2018. V. 11. P. 79. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1063-6>
21. Markov A.V., Gusakov A.V., Kondratyeva E.G., Okunev O.N., Bekkarevich A.O., Sinitsyn A.P. // Biochem. 2005. V. 70. P. 657–663. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0166-4>
22. Gusakov A.V., Semenova M.V., Sinitsyn A.P. // J. Anal. Chem. 2010. V. 65. P. 1446–1461. <https://doi.org/10.1134/S1061934810140030>
23. Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Horn S.J., Liu Z., Zhai H., Sørlie M., Eijsink V.G. // Science. 2010. V. 330. № 6001. P. 219–222. <https://doi.org/10.1126/science.1192231>
24. Гусаков А.В., Сеницын А.П. // В кн.: Химия биомассы: биотоплива и биопластики [Ред. С.Д. Варфоломеев]. М.: Научный мир, 2017. С. 65–99.
25. Доценко Г.С., Чекушина А.В., Кондратьева Е.Г., Правильников А.Г., Андрианов Р.М., Осипов Д.О. и др. // Лесной Вестник. 2012. Т. 8. С. 129–135.
26. Karp S.G., Osipov D.O., Semenova M.V., Rozhkova A.M., Zorov I.N., Sinitsyna O.A., Soccol C.R., Sinitsyn A.P. // Agronomy. 2020. V. 10. № 9. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091348>
27. Новожиллов Е.В., Синельников И.Г., Аксенов А.С., Чухчин Д.Г., Тышкуннова И.В., Рожкова А.М., Осипов Д.О., Зоров И.Н., Сеницын А.П. // Катализ в промышленности. 2015. Т. 15. № 5. С. 78–83. <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2015-5-78-83>
28. Проскура О.В., Короткова О.Г., Рожкова А.М., Кондратьева Е.Г., Матыс В.Ю., Зоров И.Н., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Немашкалов В.А., Бубнова Т.В., Сеницын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 6. С. 592–599. <https://doi.org/10.7868/S0555109915060124>

A New Enzyme Preparation Containing Polysaccharide Monooxygenase and β -Glucosidase – Synergistic Additives to Cellulases

M. V. Semenova^{a,*}, A. V. Gusakov^b, V. D. Telitsin^b, V. Y. Matys^c, T. V. Bubnova^c, V. A. Nemashkalov^c,
A. M. Rozhkova^a, and A. P. Sinitsyn^{a,b}

^a Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^b Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, 119991 Russia

^c G.K. Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: margo@mail.ru

Based on the recipient strain of *Penicillium verruculosum* B1-537 (Δ niaD) using the promoter of cellobiohydrolase I gene, a producer of homologous lytic polysaccharide monooxygenase (PMO) and heterologous β -glucosidase *Aspergillus niger* (BG) – auxiliary enzymes for the “basic” cellulase complex consisting of endoglucanases and cellobiohydrolase – was obtained. The enzyme preparation PMO-BG was obtained, containing 34% PMO and 43% BG, which was used as a source of auxiliary enzymes that increase the effectiveness of basic cellulases *P. verruculosum* by 20–100% in the bioconversion of various types of cellulose-containing raw materials: microcrystalline cellulose, pretreated with alkali cane and semi-green sulfate deciduous cellulose of Arkhangelsk Pulp and Paper Mill JSC.

Keywords: polysaccharide monooxygenase, β -glucosidase, cellulases, synergism, bioconversion