

БИОКОНВЕРСИЯ ВОЗОБНОВЛЯЕМОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ В ПОЛЕЗНЫЕ ПРОДУКТЫ – ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ЦЕЛЛЮЛАЗНОГО ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА

Синицын А.П.^{1,2}, Шашков И.А.², Гусаков А.В.^{1,2}, Синицына О.А.^{1,2}, Рожкова А.М.^{1,2}, Зоров И.Н.^{1,2}, Кондратьева Е.Г.², Короткова О.Г.², Рубцова Е.А.², Семёнова М.В.², Сатрутдинов А.Д.², Осипов Д.О.², Волков П.В.², Баширова А.В.², Доценко А.С.²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

ул. Ленинские Горы, 1, г. Москва, 119991, РФ

²ФИЦ Биотехнологии РАН

Ленинский пр., 33, г. Москва, 119071, РФ

Поступила в редакцию: 25.06.2018

Аннотация. Растительная биомасса является основным видом органической материи на Земле. Целлюлоза растительной биомассы может быть конвертирована ферментативным путем в глюкозу, из которой, далее, можно получать разные виды топлива (этанол, бутанол и др.), этилен, органические и аминокислоты, полимеры, кормовой белок и многие другие полезные продукты. Для биоконверсии целлюлозосодержащего сырья в глюкозу требуются гидролитические ферменты трех типов: эндоглюканазы, целлобиогидролазы и β -глюкозидазы, а также оксидоредуктазы (полисахаридмонооксигеназы). В данной работе изучены возможности улучшения гидролитической способности секреторного ферментного комплекса *Penicillium verruculosum* с помощью добавления к нему методами генетической инженерии гомологичных и гетерологичных целлюлаз в различных комбинациях и соотношениях: полисахаридмонооксигеназы (эндоглюканазы IV) *Trichoderma reesei*, эндоглюканазы II и целлобиогидролазы I *P. verruculosum*, а также β -глюкозидазы *Aspergillus niger*. Определено оптимальное соотношение компонентов целлюлазного комплекса для увеличения эффективности ферментативной деструкции целлюлозы, достигнуто (до двух раз) увеличение каталитической активности ферментных препаратов, полученных с помощью новых рекомбинантных штаммов-продуцентов, по сравнению с базовым ферментным комплексом исходного штамма *P. verruculosum*.

Ключевые слова: целлюлазы, возобновляемая растительная биомасса, ферментативная конверсия целлюлозы, генетическая инженерия, *Penicillium verruculosum*.

ВВЕДЕНИЕ

Растительная биомасса является основным видом органической материи на Земле. Общие запасы растительной биомассы составляют примерно 1 трлн т, а ежегодный прирост биомассы в мире составляет до 5 млрд т [1]. Целлюлоза растительной биомассы может быть конвертирована ферментативным путем в глюкозу. В свою очередь глюкоза является незаменимым сырьем для микробиологических процессов получения топлива (этанола, бутанола и др.), этилена, органических и аминокислот, полимеров, кормового белка и многих других полезных продуктов. Таким образом реализуется так называемая концепция «биофабрики» (biorefinery), сутью которой является превращение альтернативного возобновляемого растительного сырья в продукты, которые традиционно получают из невозобновляемого ископаемого углеводородного сырья [2]. Подобные биотехнологии были апробированы в пилотном масштабе. Начиная с 2005 г., в разных странах были построены демонстрационные фабрики по производству биоэтанола из лигноцеллюлозных отходов (биотоплива второго поколения), а в 2012 г. в Крешентино (Италия) начал работать первый крупномасштабный завод мощностью около 80 млн. л спирта в год [3]. К настоящему времени в США и Бразилии уже функционируют несколько подобных предприятий.

Ключевой стадией переработки растительного целлюлозосодержащего сырья является его каталитическое превращение с помощью ферментов в глюкозу. Для эффективной конверсии целлюлозы используются ферментные комплексы целлюлаз, полученные с использованием различных грибных штаммов-продуцентов (микроскопические грибы родов *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Humicola* и др.). В состав таких ферментных комплексов входят в различном соотношении ключевые ферменты, участвующие в гидролизе целлюлозы, – эндоглюканазы (ЭГ), осуществляющие деструкцию целлюлозы до фрагментов небольшого размера, целлобиогидролазы (ЦБГ), превращающие целлюлозу и продукты действия эндоглюканаз в целлобиозу, и β -глюкозидазы (БГ), гидролизующие целлобиозу до глюкозы [3]. Помимо гидролитических ферментов для конверсии целлюлозы необходимы т.н. синергитические белки [3,4], наиболее важным из которых являются белки оксидоредуктазы (полисахаридмонооксигеназы), относящимся к 9 семье ферментов с вспомогательной активностью (семья AA9), которые ранее квалифицировали как гликозил-гидролазы 61 семьи (GH61). Присутствие относительно небольшого количества ферментов этого типа в карбогидразном целлюлазном комплексе повышает общую степень конверсии целлюлозы [5] поскольку ферменты AA9 (GH61) расщепляя целлюлозную цепь в произвольной позиции, разрыхляют кристаллические участки целлюлозы и

формируют дополнительные свободные концевые группы для действия основных гидролитических ферментов – целлюбогидролаз.

Как правило, секретируемый микроорганизмами-продуцентами природный ферментный комплекс целлюлаз недостаточно эффективен для полноценной конверсии целлюлозы и требуется либо введение в его состав новых компонентов, либо изменение соотношения уже секретируемых компонентов комплекса, что может осуществляться с помощью методов и подходов генетической инженерии. Поиск новых, более активных целлюлаз и их продуцентов, улучшение свойств уже известных ферментов и усовершенствование микробных штаммов-продуцентов с помощью современных методов белковой и генетической инженерии приобретают в настоящее время важное значение [3].

Штамм мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* является перспективным продуцентом гидролитического комплекса ферментов карбогидраз и секретирует высокоактивный целлюлазный комплекс [6, 7]. Поэтому использование гриба *P. verruculosum* как базового штамма для получения ферментных препаратов, гидролизующих целлюлозу с повышенной эффективностью, является актуальной задачей.

В данной работе мы описываем возможности улучшения гидролитической способности секреторного ферментного комплекса *P. verruculosum* с помощью добавления к нему с использованием методов генетической инженерии гомологичных и гетерологичных целлюлаз в различных комбинациях и соотношениях – эндоглюканазы 4 (ЭГ4) *Trichoderma reesei*, эндоглюканазы 2 (ЭГ2) и целлюбогидролазы 1 (ЦБГ1) *P. verruculosum*, а также β -глюкозилазы *Aspergillus niger*. Отметим что полисахаридмонооксигеназа *T. reesei*, которая относится к семье AA9 (GH61), ранее из-за структурной схожести с эндоглюканазами была квалифицирована как ЭГ4 *T. reesei* и её до недавнего времени считали малоактивной эндоглюканазой [4], поэтому мы сохранили традиционное название этого фермента (ЭГ4).

Материалы и методы. Методы клонирования целевых генов, а также методы определения качественного и количественного состава препаратов описаны нами в работах [8,9]. Ферментные препараты были получены лиофильным высушиванием культуральных жидкостей исходного штамма *P. verruculosum* В1-537 и рекомбинантных штаммов, выращенных в 3-л ферментерах. Ферментные препараты получены в ИБФМ РАН им. Г.К. Скрыбина (Пушино).

Эксперименты по определению гидролитической способности ферментных препаратов 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, pH 5,0 при перемешивании 250 об./мин. Ферментные препараты в реакционную смесь добавляли в пересчете на белок (5 мг белка на 1 г сухого вещества субстрата). Конечный объем реакционной смеси составил 20 мл. Гидролиз проводили в течение 24 часов.

Реакционная ячейка представляла собой пластиковый сосуд объемом 50 мл с крышкой, для обеспечения дополнительного перемешивания реакционной смеси в ячейку помещали металлический цилиндр (d = 7 мм, h = 10 мм) из нержавеющей стали. Через определенные промежутки времени (3, 12 и 24 часа) из реакционной смеси отбирали пробы (0,5 мл), центрифугировали 3 мин при 10 000 об/мин и измеряли в супернатанте концентрацию восстанавливающих сахаров (ВС) методом Шомоди–Нельсона [9].

За критерий гидролитической способности принимали концентрацию ВС в реакционной смеси, образовавшихся за 24 часа. В качестве субстратов были использованы измельчённые микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) и осиновая древесина (размер частиц после помола составлял 5-10 мкм), измельчение проводили в ОАО ГосНИИ биосинтеза белковых веществ на планетарной мельнице-активаторе типа АГО-2С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Модификация исходного ферментного комплекса *P. verruculosum* была осуществлена с помощью добавления в его состав гомологичных и гетерологичных ферментов в результате клонирования кодирующих их генов в исходный (реципиентный) штамм *P. verruculosum* В1-537 под управлением индуцибельного промотора гена *cbh1*, кодирующего целлюбогидролазу 1 (ЦБГ1). *Cbh1* промотор является «сильным промотором», обеспечивающим высокий уровень экспрессии управляемого им гена [8]. С помощью *cbh1* промотора были клонированы гены ЭГ4 (*egl4*) *T. reesei*, ЭГ2 (*egl2*) и ЦБГ1 (*cbh1*) *P. verruculosum*, а также БГ (*bglA*) *A. niger*.

На основе штамма-реципиента *P. verruculosum* В1-537 с помощью использования *cbh1* промотора было получено 5 различных новых рекомбинантных штаммов *P. verruculosum*, продуцирующих модифицированные ферментные комплексы, включающие в различных сочетаниях и соотношениях ферменты как исходного (базового) ферментного комплекса *P. verruculosum*, так и ферменты, гены которых были клонированы. Были получены рекомбинантные штаммы с клонированными индивидуальными генами ЭГ4 (ферментный препарат № 2) или БГ (препарат № 3), с клонированными одновременно генами ЭГ4 и БГ (препарат №4), ЦБГ1, ЭГ2 и БГ (препарат № 5), и ЭГ4, ЦБГ1, ЭГ2 и БГ (препарат № 6). В качестве контроля использовали препарат № 1, полученный на основе штамма-реципиента.

Для ферментных препаратов, полученных с помощью новых рекомбинантных штаммов, были определены компонентный состав (по методике, описанной нами в работах [9, 10]), а также гидролитическая способность по отношению к измельчённым МКЦ и осиновой древесине, которую оценивали по выходу ВС через 24 часа гидролиза.

Таблица 1. Компонентный состав ферментных препаратов (ФП), полученных на основе *P. verruculosum* (в % от общего содержания белка). Содержание не-целлюлазных ферментов не приведено

№ ФП	Клонированные гены	Содержание ферментов							
		ЦБГ1	ЦБГ2	ЭГ1	ЭГ2	ЭГ3	БГ	БГ <i>A. niger</i>	ЭГ4 <i>T. reesei</i>
1	Штамм-реципиент В1-537	35	21	5	3	2	3	-	-
Ферменты, гены которых были клонированы с помощью целлобиогидролазного промотора <i>cbh1</i>									
2	ЭГ4	23	15	2	2	3	3	-	24
3	БГ	40	17	4	4	4	3	11	-
4	БГ + ЭГ4	27	20	5	3	5	3	18	1
5	ЦБГ1+ЭГ2+БГ	30	14	6	30	2	3	8	-
6	ЦБГ1+ЭГ2+БГ+ЭГ4	27	12	5	35	2	3	10	1
Ферменты, гены которых были клонированы с помощью гистонового промотора <i>h4.1</i>									
7	ЦБГ1+БГ	37	20	7	5	6	3	5	-

Контрольный препарат № 1 содержал базовый комплекс собственных целлюлолитических ферментов штамма-реципиента *P. verruculosum* В1-537, который имел следующий состав (здесь и далее – в % от общего содержания белка в ферментном препарате, таблица 1): ЦБГ1 – 35 %, ЦБГ2 – 21 % (суммарное содержание целлобиогидролаз – 56 %), суммарное содержание эндоглюканаз (ЭГ1, ЭГ2, ЭГ3) – 10 %, БГ – 3 %.

Ферментный препарат № 2, полученный с помощью рекомбинантного штамма с клонированным геном гетерологичной ЭГ4 *T. reesei*, содержал существенное её количество – 24 %, при этом собственный целлюлазный комплекс *P. verruculosum* оказался несколько редуцирован, наиболее заметно уменьшилось содержание ЦБГ1 (с 35 до 23 %, табл. 1). Гидролитическая способность полученного ферментного препарата по отношению к МКЦ и измельченной осиновой древесине несколько превосходила таковую для контрольного препарата №1 (выход ВС после 24 часов гидролиза МКЦ и осиновой древесины составлял 18 и 30 г/л для рекомбинантного ферментного препарата № 2 по сравнению с 16 и 28 г/л для контрольного препарата № 1, соответственно, табл. 2).

Как отмечалось выше, бета-глюкозидаза является ферментом, гидролизующим до глюкозы целлобиозу. Это является важным не только для получения глюкозы, как целевого продукта, но и для общего увеличения эффективности процесса ферментативной конверсии целлюлозосодержащего сырья эндоглюканазами и целлобиогидролазами, поскольку целлобиоза ингибирует эти ферменты (глюкоза обладает значительно меньшим ингибирующим эффектом, чем целлобиоза) [3]. Таким образом, обеспечение достаточно высокого содержания β-глюкозидазы является необходимым условием высокой гидролитической способности целлюлолитического ферментного комплекса.

Ферментный препарат № 3 был получен с помощью рекомбинантного штамма *P. verruculosum* с клонированным геном гетерологичной БГ *A. niger* и содержал в дополнение к собственной гомологичной БГ (3 % от общего содержания белка) БГ *A. niger* (11 %, табл. 1). Отметим при этом, что препарат № 3 характеризовался практически полным сохранением состава собственного целлюлазного комплекса *P. verruculosum* по сравнению с контрольным препаратом № 1: ЦБГ1 – 40 %, ЦБГ2 – 17 % (суммарное содержание целлобиогидролаз – 57 %), суммарное содержание эндоглюканаз – 12 %.

Ферментный препарат № 4 был получен с помощью рекомбинантного штамма *P. verruculosum* с клонированными генами гетерологичных БГ *A. niger* и ЭГ4 *T. reesei* (18 и 1 % от общего содержания белка, соответственно, табл. 1). Этот препарат характеризовался некоторым уменьшением содержания собственной ЦБГ1 (27 %), при этом содержание ЦБГ2 (20 %) и суммарное содержание эндоглюканаз (13 %) практически не изменилось по сравнению с базовым целлюлазным комплексом *P. verruculosum*.

Гидролитическая способность препаратов № 3 и 4 по отношению к МКЦ превышала контрольные значения почти в 2 раза (выход ВС составил 32-33 г/л, табл. 2). Выход ВС при гидролизе измельченной осиновой древесины препаратами № 3 и 4 составил около 35-36 г/л, что превышало выход ВС при гидролизе этого субстрата контрольным ферментным препаратом №1 в 1,3 раза.

Препарат № 5 был получен с помощью рекомбинантного штамма *P. verruculosum* с клонированными генами гомологичных ЦБГ1 и ЭГ2, а также с клонированным геном гетерологичной БГ *A. niger* – этот препарат имел близкое с контрольным содержание ЦБГ1 (30 %) и заметно увеличенное содержание ЭГ2 (30 %); содержание гетерологичной БГ *A. niger* составило 8 %. Препарат характеризовался заметным пониженным по сравнению с контрольным содержания собственной ЦБГ2 (14%, табл. 1).

Препарат № 6 был получен с помощью рекомбинантного штамма *P. verruculosum* с клонированными гомологичными генами ЦБГ1 и ЭГ2, а также клонированными гетерологичными генами БГ *A. niger* и ЭГ4 *T. reesei* – он содержал 27 % ЦБГ1 35 % ЭГ2, 12% ЦБГ2, 10% БГ *A. niger* и 1% ЭГ4 (табл. 1).

Гидролитическая способность препаратов № 5 и 6 по отношению к МКЦ (выход ВС 25 и 31 г/л, соответственно) была выше, чем у контрольного ферментного препарата №1 (выход ВС – 16 г/л); гидролитическая способность этих препаратов по отношению к измельченной осиновой древесине также превосходила таковую для контрольного препарата (выходы ВС составили 30 и 32 г/л против 28 г/л у контрольного препарата № 1, табл. 2). Однако, в целом, гидролитическая способность препаратов № 5 и 6 несколько уступала таковой для препаратов № 3 и 4. Причиной этого может быть уменьшение общего содержания ферментов целлюлогидролизного блока у препаратов №5 и 6 (суммарное содержание целлюлогидролаз у этих ФП уменьшилось до 44 и 39 % по сравнению с 56 % у контрольного препарата № 1). Уменьшение содержания целлюлогидролаз у препаратов №5 и 6 происходит за счёт заметного увеличения содержания ЭГ2 – до 30-35 % в рекомбинантных препаратах по сравнению с 9% у контрольного препарата № 1.

Обобщая результаты исследований, связанных с клонированием генов эндоглюканаз ЭГ4 *T. reesei* и ЭГ2 *P. verruculosum*, целлюлогидролазы ЦБГ1 *P. verruculosum*, а также БГ *A. niger* с использованием *cbh1* промотора, следует заключить, что дополнительное введение гомологичных и гетерологичных целлюлаз и монооксигеназ в состав исходного целлюлазного комплекса *P. verruculosum* несомненно позволило увеличить его гидролитическую способность. Особенно заметно гидролитическая способность увеличивалась в случае клонирования индивидуального гена БГ *A. niger* (препарат № 3, содержание БГ *A. niger* составило 11 %), а также совместного клонирования генов ЭГ4 *T. reesei* и БГ *T. reesei* (препарат № 4 содержащий 1 % ЭГ4 и 18 % БГ) – очевидно, что увеличение гидролитической способности этих ферментных препаратов по сравнению с контрольным было достигнуто в первую очередь за счёт увеличения содержания БГ без заметного редуцирования содержания других ферментов целлюлазного комплекса *P. verruculosum*, в особенности целлюлогидролаз, являющихся основными деструкторами целлюлозы.

Одновременное клонирование генов ЭГ2, ЦБГ1 и БГ *A. niger* (препарат № 5), а также генов ЭГ4 *T. reesei*, ЭГ2, ЦБГ1 и БГ *A. niger* (препарат № 6) тоже приводило к увеличению гидролитической способности соответствующих рекомбинантных ферментных препаратов – это происходило за счет увеличения содержания ЦБГ1, ЭГ2 и БГ. По всей вероятности, можно было бы ожидать большего увеличения гидролитической способности препаратов ФП № 5 и 6, если бы содержание в них ЭГ2 было бы меньше, а содержание ЦБГ1, напротив, было бы увеличено.

Таблица 2. Гидролитическая способность ферментных препаратов (ФП), полученных с помощью рекомбинантных штаммов *P. verruculosum* (выход ВС через 24 часа гидролиза), дозировка ФП по белку – 5 мг/г субстрата, концентрация субстрата – 100 г/л (рН 5,0, 50 °С)

№ ФП	Клонированные гены	МКЦ, [ВС], г/л	Измельчённая осиновая древесина [ВС], г/л
1	Штамм-реципиент В1-537 (производитель контрольного ФП)	16	28
Ферменты, гены которых были клонированы с помощью целлюлогидролазного промотора <i>cbh1</i>			
2	ЭГ4	18,0 ± 0,1	30 ± 0,2
3	БГ	33,0 ± 0,2	36 ± 0,3
4	БГ + ЭГ4	32 ± 0,2	35 ± 0,2
5	ЦБГ1+ЭГ2+БГ	25 ± 0,1	30 ± 0,2
6	ЦБГ1+ЭГ2+БГ+ЭГ4	31 ± 0,2	32 ± 0,2
Ферменты, гены которых были клонированы с помощью гистонового промотора <i>h4.1</i>			
7	ЦБГ1+БГ	32 ± 0,2	36 ± 0,3

Клонирование гена индивидуальной ЭГ4 *T. reesei* (препарат № 2 содержащий 24 % ЭГ4) в нашем случае приводило к определённой увеличению гидролитической способности препарата № 2 по сравнению с контролем – вероятно, за счёт существенного увеличения содержания ЭГ4, однако, уровень гидролитической способности препарата № 2 отстаёт от максимально достигнутого, что происходит, очевидно, за счёт редуцирования уровня общего содержания целлюбогидролаз (38 %) и эндоглюканаз (7 %) по сравнению с базовым целлюлазным комплексом *P. verruculosum*, имеющего в своём составе 56 % целлюбогидролаз и 10 % эндоглюканаз, соответственно.

Некоторое уточнение оптимального состава целлюлазного комплекса были осуществлено нами с использованием альтернативной системы экспрессии, основанной на применении менее «сильного», чем *cbh1* конститутивного промотора гена *h4.1 P. verruculosum*, кодирующего белок гистон H4.1, относящимся к классу ядерных белков, выполняющих две основные функции – участие в упаковке нитей ДНК в ядре и осуществление регуляции таких ядерных процессов, как транскрипция, репликация и репарация. Характерной особенностью такой системы экспрессии является то, что её использование не сильно меняет состав исходного ферментного комплекса и не влияет на продуктивность гриба [8].

В качестве реципиентного был использован штамм *P. verruculosum* Hist4 [8]. С помощью гистонового промотора *h4.1* были одновременно клонированы гены ЦБГ1 *P. verruculosum* и БГ *A. niger*. В результате был получен новый рекомбинантный штамм и, его помощью, новый ферментный препарат № 7, состав которого был следующим: ЦБГ1 – 37 %, ЦБГ2 – 20 %, суммарное содержание эндоглюканаз – 18 %, содержание гетерологичной БГ *A. niger* – 5 %, содержание гомологичной БГ *P. verruculosum* – 3 % (табл. 1). Этот ферментный препарат имел повышенную гидролитическую способность и обеспечивали выход ВС при гидролизе МКЦ до 32 г/л, при гидролизе измельчённой осинового древесины – до 36 г/л (табл. 2). Отметим, что препарат № 7 характеризовался примерно такой же гидролитической способностью, как и наилучшие с этой точки зрения препараты №3 и 4, полученные с помощью использования *cbh1* промотора.

Таким образом, обобщая полученные данные, можно заключить, что оптимальным составом целлюлазного комплекса для осуществления максимально эффективного процесса биоконверсии целлюлозы может быть следующий: ЦБГ1 – 36-41 %, ЦБГ2 – 16-19 %, суммарное содержание эндоглюканаз – 12-18 %, содержание гетерологичной БГ *A. niger* 5-11 %. Кроме того, в состав ферментного комплекса могут входить полисахаридмонооксигеназы (семья AA9, в нашем случае – ЭГ4 *T. reesei*), содержание которых должно составлять от 1 % и более (но не меньше 24 %).

Список литературы / References:

1. Bioprocessing of renewable resources to commodity bioproducts. First edition. Wiley and Sons, ed. V.S.Bisaria, A. Kondo, New York, 2014.
2. *From the Sugar Platform to biofuels and biochemical*. Final report for the European Commission Directorate-General Energy, April 2015, 136 p.
3. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P. Depolymerization of natural biopolymers. Enzymatic hydrolysis of cellulose. *Chemistry of biomass: biofuels and bioplastics*, Moscow, 2017, pp. 65-69.
4. Jung K., Hee J.L., In-Geol C., Kyoung Hean K. Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulose. *Appl.Microbiol.Biotechnol*, 17 August, 2014, epub, DOI: 10.1007/s00253-014-6001-3.
5. Harris P. V., Welner D., McFarland, K.C., Re E., Poulsen J.C.N., Brown K., Salbo R., Ding H., Vlasenko E., Merino S., Xu F., Cherry J., Larsen S., Leggio L.L. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase Family 61: structure and function of large, enzymatic family. *Biochemistry*, 2010, vol. 49, pp. 3305-3316.
6. Skomarovsky A.A., Gusakov A.V., Okunев O.N., Soloveva I.V., Bubnova T.V., Kondrateva E.G., Synitsyn A.P. Studies of hydrolytic activity of enzyme preparation of *Penicillium* and *Trichoderma* fungi. *Appl.Biochem.Microbiol*, 2005, vol. 41, pp. 182-184.
7. Martins L.F., Kolling D., Camassola M., Dillon A.J., Ramos L.P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresource Technol.*, 2008, vol. 99, pp. 1417-1424.
8. Dotsenko G.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Korotkoba O.G., Sinitsyn A.P. Heterologous β -glucosidase in a fungal cellulase system: comparison of different methods for development of multienzyme cocktail. *Process Biochemistry*, 2015, vol. 50, pp. 1258-1263.
9. Sinitsyn A.P., Osipov D.O., Rozhkova A.M., Bushina E.V., Dotsenko G.S., Sinitsyna O.A., Kondratieva E.G., Zorov I.N., Okunев O.N., Nemashkalov V.A., Matys V.Yu., Koshelev A.V. Production of highly effective enzyme complexes of cellulases and hemicellulases for the hydrolysis of plant materials based on the strain *Penicillium verruculosum*. *Biotechnologia*, 2013, no. 5, pp. 40-53.
10. Proskurina O.V., Korotkova O.G., Rozhkova A.M., Matys V.Yu., Koshelev A.V., Okunев O.N., Nemashkalov V.A., Sinitsyna O.A., Sinitsyn A.P. The use of technology "fusion" to create high-performance biocatalysts, based on recombinant strains of the fungus *Penicillium verruculosum* for the conversion of biomass cellulose containing biomass. *Catalysis in Industry*, 2013, no. 5, pp. 65-73.

**BIOCONVERSION OF RENEWABLE PLANT FEEDSTOCKS INTO USEFUL PRODUCTS –
OPTIMIZATION OF CELLULASES ENZYME COMPLEX**

**Sinitsyn A.P.^{1,2}, Shahskov I.A.², Gusakov A.V.^{1,2}, Sinitsyna O.A.^{1,2}, Rozhkova A.M.^{1,2},
Zorov I.N.^{1,2}, Kondratieva E.G.², Korotkova O.G.², Rubtsova E.A.², Semenova M.V.², Satrutdinov A.D.²,
Osipov D.O.², Volkov P. V.², Bashirova A.V.², Dotsenko A.S.²**

¹M.V.Lomonosov Moscow State University
Leninskie gory str., 1, Moscow, 119991, Russia

²FRC Biotechnology RAS
Leninskiy dis., 33, Moscow, 119071, Russia

Abstract. Plant biomass is the main type of organic matter on Earth. Cellulose of plant biomass can be converted enzymatically into glucose, from which further can be obtained different fuels (ethanol, butanol, etc.), ethylene, organic and amino acids, polymers, feed protein and many other useful products. For bioconversion of cellulose-containing raw materials into glucose, hydrolytic enzymes of three types are required: endoglucanase, cellobiohydrolase and β -glucosidase, as well as oxidoreductase (polysaccharide monooxygenase). In this paper, we studied the possibility of improving the hydrolytic ability of the secretory enzyme complex *Penicillium verruculosum* by adding to it by genetic engineering methods of homologous and heterologous cellulases in various combinations and ratios: polysaccharide monooxygenase (endoglucanase IV) *Trichoderma reesei*, endoglucanase II and cellobiohydrolase I *P. verruculosum*, and β -glucosidase *Aspergillus niger*. The optimal ratio of the components of the cellulase complex to increase the efficiency of the enzymatic destruction of cellulose was determined, an increase in the catalytic activity of enzyme preparations obtained with the help of new recombinant strains-producers was achieved up to two times compared with the basic enzyme preparation of the initial strain of *P. verruculosum*.

Key words: cellulases, renewable plant biomass, cellulose enzymatic conversion, genetic engineering, *Penicillium verruculosum*.