НАУЧНЫЙ ОБЗОР

УДК 573.6; 577.151; 579.66:663.15

# КАРБОГИДРАЗЫ – 50 ЛЕТ ИССЛЕДОВАНИЙ НА КАФЕДРЕ ХИМИЧЕСКОЙ ЭНЗИМОЛОГИИ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА, ИСТОРИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

**Аркадий Пантелеймонович Синицын[1], Ольга Аркадьевна Синицына[1], Иван Никитич Зоров[1], Александра Михайловна Рожкова[1, 2]**

[1] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
[2] Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

**Автор, ответственный за переписку:** Александра Михайловна Рожкова, amrojkova@yahoo.com

**Аннотация.** Изложена история развития исследований карбогидраз, проводимых на кафедре химической энзимологии с середины 1970-х годов по настоящее время. Приведены результаты, касающиеся механизма и кинетики процессов ферментативной конверсии целлюлозы и возобновляемого растительного сырья (ВРС) под действием мультиферментных целлюлазных комплексов; роли индивидуальных компонентов этих комплексов – базовых (эндоглюканаз и целлобиогидролаз), вспомогательных ферментов (полисахаридмонооксигеназы, β-глюкозидазы, ксиланазы) и их синергетического взаимодействия. Описаны особенности использования для биоконверсии ВРС реакторов различной конструкции: периодического действия, непрерывного действия колонного типа, реактора для осуществления гидролиза в постоянном электрическом поле, реактора с интенсивным перемешиванием ферромагнитными частицами в переменном магнитном поле. Обсуждены возможности увеличения реакционной способности растительного сырья с помощью различных методов предобработки, а также влияние структурных и физико-химических факторов целлюлозы на эффективность ее ферментативной конверсии. Приведены данные по созданию высокоактивных штаммов микроскопических грибов – продуцентов целлюлаз и других карбогидраз с помощью методов индуцированного мутагенеза – родов *Trichoderma (Hypocrea), Penicillium (Talaromyces), Aspergillus, Chrysosporium (Myceliophtora),* а также данные по составу продуцируемых ими ферментных комплексов и формирующих их ферментов. Описано создание экспрессионных систем на базе грибов *P. canescens* и *P. verruculosum* и конструирование с их помощью рекомбинантных штаммов – продуцентов, позволивших получить ферментные препараты (ФП), обеспечивающие высокую эффективность процессов биоконверсии ВРС, а также создать продуценты широкого круга карбогидраз для практического применения в разных отраслях промышленности и сельского хозяйства. Ряд промышленно важных ФП, полученных с помощью экспрессионной системы *P. verruculosum*, производится в настоящее время на заводе ООО «Агрофермент».

**Ключевые слова:** карбогидразы, целлюлазы, растительное сырье, целлюлозы, предобработка, штаммы-продуценты, генетическая инженерия, технические ферменты, *Trichoderma, Penicillium*

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-4-312-333

© Синицын А.П., Синицына О.А., Зоров И.Н., Рожкова А.М , 2023

**Список сокращений:** ВРС – возобновляемое растительное сырье, СП – степень полимеризации, ЭГ – эндоглюканазы, ЦБГ – целлобиогидролазы, БГЛ – β-глюкозидазы, ЛПМО – литическая полисахаридмонооксигеназа, МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза, ВС – восстанавливающие сахара, ФП – ферментный препарат, НПС – некрахмальные полисахариды, ФОС – фруктоолигосахариды, ГРП – гидроразрыв пласта, КЖ – культуральная жидкость.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке государственного задания «Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды» (#121041500039-8).

**Для цитирования:** Синицын А.П., Синицына О.А., Зоров И.Н., Рожкова А.М. Карбогидразы – 50 лет исследований на кафедре химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова, история и перспективы // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 64. № 4. С. 312–333.

SCIENTIFIC REVIEW

## CARBOHYDRASES – 50 YEARS OF RESEARCH AT THE DEPARTMENT OF CHEMICAL ENZYMOLOGY OF LOMONOSOV MOSCOW STATE UNIVERSITY, HISTORY AND PROSPECTS

**Arkady P. Sinitsyn[1], Olga A. Sinitsyna[1], Ivan N. Zorov[1], Aleksandra M. Rozhkova[1, 2]**

[1] M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Moscow, Russian Federation
[2] Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Corresponding author:** Aleksandra Mikhailovna Rozhkova, amrojkova@yahoo.com

**Annotation.** The review describes the history of the development of research on carbohydrases conducted at the Department of Chemical Enzymology from the mid-1970s to the present. The results concerning the study of the mechanism and kinetics of the processes of enzymatic conversion of cellulose and renewable plant raw materials under the action of a multi-enzyme cellulases complexes; the role of individual components of these complexes – basic (endoglucanases and cellobiohydrolases) and auxiliary enzymes (polysaccharide monooxygenase, β-glucosidase, xylanase) and their synergistic interaction. The features of using reactors of various designs for bioconversion of plant raw materials are described: periodic type, continuous column type, reactor for hydrolysis in a constant electric field, reactor with intensive mixing by ferromagnetic particles in magnetic field. The possibilities of increasing the reactivity of plant raw materials using various pretreatment methods, as well as the influence of the structural and physico-chemical properties of cellulose on the efficiency of its enzymatic conversion are discussed. Data on the creation of highly active strains of microscopic fungi-producers of cellulases and other carbohydrases using methods of induced mutagenesis – *Trichoderma (Hypocrea), Penicillium (Talaromyces), Aspergillus, Chrysosporium (Myceliophtora)* spp., as well as data on the composition of the enzyme complexes produced by them and the properties of the enzymes forming them are presented. It describes the creation of expression systems based on *P. canescens and P. verruculosum* and the production of recombinant producer strains with their help, which made it possible to obtain enzyme preparations (EP) that ensure high efficiency of bioconversion processes of plant raw materials, as well as to create producers of a wide range of carbohydrases for practical use in various fields of industry and agriculture. A number of industrially important EP obtained using the *P. verruculosum* expression system are currently being produced at the Agroferment LLC plant.

**Keywords:** transcription, CRISPR/CAS9, cellobiohydrol carbohydrases, cellulases, plant raw materials, cellulose, pretreatment, strains-producers, genetic engineering, technical enzymes, *Trichoderma, Penicillium*

**Financial Support.** The work was supported by the State Assignment "Molecular design, structural-functional analysis and regulation of enzyme systems, cell structures, bionanomaterials: fundamentals and applications in technology, medicine, environmental protection" (#121041500039-8).

**For citation:** Sinitsyn A.P., Sinitsyna O.A., Zorov I.N., Rozhkova A.M. Carbohydrases – 50 years of research at the department of chemical enzymology of Lomonosov Moscow State University, history and prospects // Vestn. Moscow. un-ta. Ser. 2. Chemistry. T. 64. № 4. S. 312–333.

## Целлюлазы, биоконверсия растительного сырья

Карбогидразы представляют собой широкий класс ферментов, многие из которых выпускаются биотехнологической промышленностью и находят широкое практическое применение. Начало исследования карбогидраз – ферментов, гидролизующих О-гликозильные соединения (КФ 3.2.1…) – было положено на кафедре химической энзимологии в середине 1970-х годов И.В. Березиным, который создал научную группу под руководством А.А. Клёсова. В состав этой группы входил аспирант М.Л. Рабинович, задачей которого было исследование кинетики ферментативных реакций в гетерогенных системах на примере фермента лизоцима, катализирующего реакцию лизиса клеточной стенки бактерий *Micrococcus lysodeikticus*. Была начата разработка теоретических и экспериментальных подходов к изучению кинетики и механизма действия ферментативной деструкции нерастворимых в водной среде сложных по структуре полисахаридных субстратов [1–3].

Принципиальное значение для выбора направления дальнейших исследований имело то, что вскоре (в конце 1970-х – начале 1980-х годов) круг исследуемых ферментов был расширен за счет включения в него целлюлаз [4] и глюкоамилазы [5, 6] – ферментов весьма важных для практического применения в области биоконверсии возобновляемого растительного сырья (ВРС).

В тот период ферментативная деструкция целлюлозы с точки зрения классической энзимологии представляла собой сложный процесс. Было понятно, что один (единственный) фермент не способен осуществить превращения целлюлозы в глюкозу, для этого необходим мультиферментный комплекс, согласованно действующий на полимерный кристаллический субстрат, каковым является целлюлоза; каталитическая конверсия такого субстрата происходит на его поверхности, что, в свою очередь, обусловливает важную роль диффузионных и адсорбционных процессов ферментов.

В литературе того времени обсуждался ряд кинетических схем, описывающих процесс ферментативной деструкции целлюлозы [7]. Доминировала так называемая $C_1$–$C_x$-концепция, предложенная в начале 50-х годов Элвином Ризом с соавторами [8]. Суть ее заключалась в том, что $C_1$-фермент расщепляет кристаллическую целлюлозу, причем он имеет негидролитическую природу и действует, разрывая водородные связи между соседними полисахаридными цепями кристаллических участков; далее в реакцию вступают гидролитические $C_x$-ферменты, расщепляющие легко доступные участки целлюлозных цепей с образованием преимущественно целлобиозы, а также глюкозы; целлобиоза далее гидролизуется до глюкозы β-глюкозидазой (целлобиазой). С развитием хроматографических методов и применением электрофореза была показана множественность $C_x$-ферментов, различающихся биохимическими свойствами и субстратной специфичностью по отношению к целлюлозе с разной степенью полимеризации (СП) [9, 10]. Общая схема ферментативной конверсии целлюлозы в 50–60-е годы [11] представлена на рис. 1.

В 1980-е годы в работах А.А. Клёсова и соавторов были развиты представления о кинетической модели ферментативной конверсии целлюлозы. Было установлено, что состав целлюлазного комплекса формируется на основе эндоглюканазы (ЭГ), целлобиогидролазы (ЦБГ) и β-глюкозидазы (БГЛ) [12–14]. Схема действия целлюлазного комплекса на целлюлозу показана на рис. 2.

Рис. 1. Общая схема ферментативной конверсии целлюлозы [11]

Гидролитической стадии предшествует стадия адсорбции ферментов на поверхности нерастворимого субстрата. Скорость адсорбции достаточно велика по сравнению со скоростью гидролиза, и перенос ферментов к поверхности субстрата не является лимитирующей стадией процесса расщепления целлюлозы [15].

Адсорбционная способность целлюлолитических ферментов может существенно различаться как для ферментов разных целлюлазных комплексов, так и для компонентов одного и того же целлюлазного комплекса, при этом эффективность (прочность) адсорбции может являться фактором, определяющим скорость конверсии кристаллической целлюлозы [16–22].

После адсорбции на первой фазе гидролитической стадии эндодеполимеразы (ЭГ) расщепляют полимерные молекулы целлюлозы, находящиеся в основном в ее аморфных участках, уменьшая СП и приводя к образованию коротких волокон целлюлозы, однако заметного количества растворимых продуктов гидролиза при этом не образуется. Тем не менее, эта фаза важна, поскольку приводит к формированию субстрата для последующего действия экзодеполимераз (ЦБГ), которые отщепляют целлобиозу и глюкозу от концевых участков молекул целлюлозы или ее фрагментов, образовавшихся под действием ЭГ и находящихся в основном в кристаллических участках целлюлозы. Целлобиоза гидролизуется под действием БГЛ до глюкозы [23]. В дальнейшем кинетическая схема и механизм ферментативной конверсии целлюлозы уточнялись и корректировались. В настоящее время принято считать, что глубокая и эффективная деструкция целлюлозы происходит под действием как гидролитических ферментов целлюлазного комплекса (эндоглюканаз, целлобиогидролаз и β-глюкозидаз (целлобиаз)), так и литических полисахаридмонооксигеназ (ЛПМО) – ферментов, расщепляющих гликозидные связи по окислительному механизму [24]. Схема деструкции целлюлозы представлена на рис. 3.

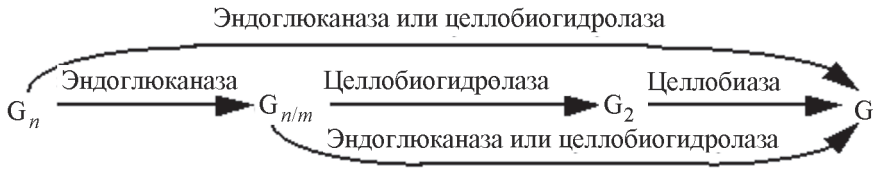


Рис. 2. Схема действия целлюлазного комплекса: $G_n$ – исходная целлюлоза, $G_{n/m}$ – нерастворимые продукты неупорядоченного гидролиза целлюлозы со значением СП меньшим, чем у исходной целлюлозы, $G_2$ – целлобиоза, G – глюкоза [12–14]

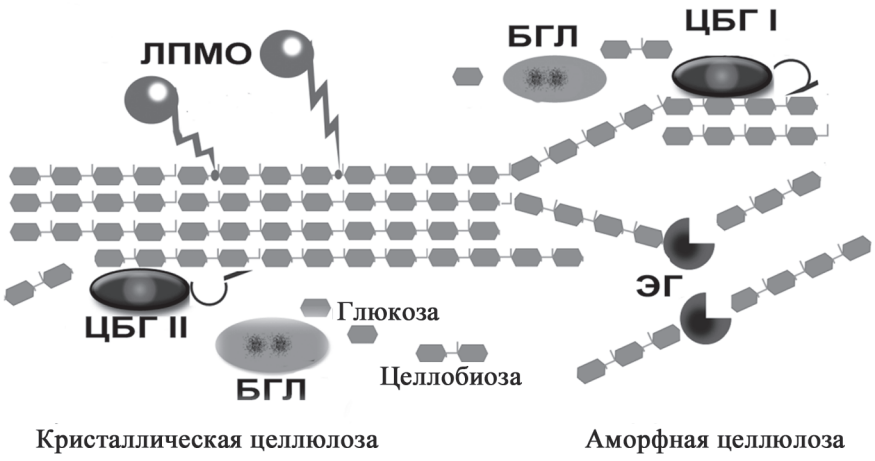


Рис. 3. Схема кооперативного действия ферментов в процессе деструкции нативной целлюлозы

Следует отметить, что для исследования механизма и кинетики действия целлюлазного комплекса и входящих в его состав ферментов использовались производимые на биохимических заводах СССР технические ферментные (целлюлолитические и иные) препараты, такие как Целловиридин (продуцент *Trichoderma viride*), Целлоконииингин (*T. koningii*), Целлолигнорин (*T. lignorum*), Целлобранин (*T. longibrachiatum*), Целлокандин (*Geotrichum candidum*) и Пектофоетидин *(Aspergillus foetidus*). Фракционирования этих ферментных препаратов (ФП) не проводили, анализ разных видов активности ФП осуществляли, используя различные субстраты. Например, активность ЭГ определяли с использованием растворимой в воде Na-соли карбоксиметилцеллюлозы с помощью вискозиметрического метода [4] или по скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС) методом Нельсона–Шомоди [12], для определения активности БГЛ применяли целлобиозу в качестве субстрата, регистрируя скорость образования глюкозы с помощью глюкозооксидазно-пероксидазного метода [25], активность ЦБГ определяли по скорости образования ВС из микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) или других видов целлюлозы в присутствии в реакционной смеси глюконолактона в качестве ингибитора БГЛ [26].

Результаты исследования процесса конверсии целлюлозных субстратов, полученные при совместном применении ФП, различающихся по ферментному составу (например, Целловиридина и Пектофоетидина), позволили сформулировать представления о синергизме в действии ферментов, входящих в состав целлюлазного комплекса [27–30]. Под синергизмом понимают взаимное увеличение эффективности действия на целлюлозу двух или нескольких компонентов ферментного комплекса при их совместном присутствии в реакционной смеси по сравнению с суммарным (аддитивным) проявлением индивидуального действия этих компонентов. Природа синергизма обусловлена реализацией кинетических закономерностей последовательно (или последовательно-параллельно) действующей мультиферментной системы, когда продукт действия одного из ферментов является субстратом для другого. Например, ЭГ осуществляет деполимеризацию целлюлозы и таким образом увеличивает концентрацию концевых участков целлюлозных цепей, являющихся субстратом для ЦБГ [31] (рис. 4). В дальнейшем эти представления были использованы для описания синергетического взаимодействия похожих полиферментных систем на примере α-амилазы и глюкоамилазы при действии на полисахаридные субстраты [32].

Большую роль в развитии исследований карбогидраз сыграло создание В.М. Черноглазовым и О.В. Ермоловой методов тонкого фракционирования ФП, выделения и очистки ферментов. С их помощью были получены в гомогенном виде ферменты целлюлазного комплекса ЦБГI и ЭГI и изучены их свойства [33–37]. Для увеличения эффективности процесса очистки ферментов и изучения их свойств были разработаны высокочувствительные методы детекции их активности в водных растворах, а также гелях с помощью 4-метилумбеллиферильных производных ди- и моносахаридов [38, 39], их 5-броминдоксил производных [40], растворимых окрашенных производных полисахаридов [31, 40–42].

С самого начала исследований целлюлаз стало очевидным, что реакционная способность природной кристаллической целлюлозы (например, хлопка) или лигноцеллюлозы (древесины различных пород, соломы злаковых) при ферментативной конверсии невелика, что сопровождается крайне низкими выходами глюкозы и других сахаров. Поэтому для увеличения реакционной способности целлюлозы и ВРС большое внимание уделялось методам их предобработки, таким как γ-облучение, механическое измельчение на шаровой мельнице, обработка минеральными кислотами (серной, фосфорной), кадоксеном, делигнификация щелочью [43–45]. Механические и химические методы предобработки приводили к существенному (в 5–10 и более раз) увеличению реакционной способности. Кроме того, исследование изменений степени кристалличности целлюлозы (методом дифракции рентгеновских лучей), доступной молекулам ферментов поверхности целлюлозы (методом адсорбции пероксидазы, а также методом термодесорбции азотно-водородной смеси), размера частиц целлюлозы (методом дисперсионного анализа с использованием оптической микроскопии), СП целлюлозы (определяемой по вязкости растворов целлюлозы в кадоксене) позволили в количественном виде сформулировать влияние этих факторов на эффективность ферментативной конверсии целлюлозы. Она линейно зависит от уменьшения степени кристалличности и увеличения площади поверхности, доступной молекулам ферментов, и мало зависит от геометрического размера частиц целлюлозы и ее СП [46, 47].

В 1970–1980-е годы в Европе, США, Канаде, Японии (странах, имеющих высокий научно-технический потенциал) большое внимание уделялось практическим разработкам в области ферментативного превращения ВРС в сахара

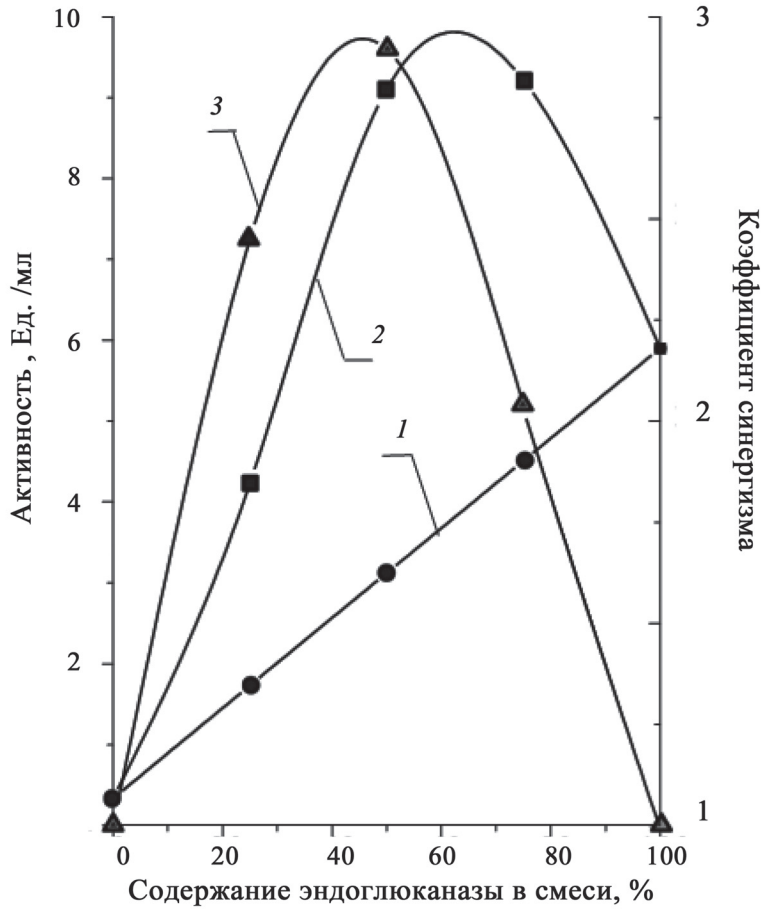


Рис. 4. Синергизм между ЦБГ и ЭГ (1 – теоретическая сумма значений активности индивидуальных ферментов, 2 – экспериментально определенная активность в смеси ферментов, 3 – коэффициент синергизма)

и этанол (моторное топливо, смесь этанола с бензином). Это было вызвано, с одной стороны, наличием значительного количества ВРС, с другой – возможностью его превращения гидролитическим и/или микробиологическим путем в различные продукты, находящие применение в пищевой и химической промышленности, а также в заменители нефтепродуктов [48]. В Советском Союзе гидролизная промышленность составила целую отрасль народного хозяйства, в основе ее лежал кислотный гидролиз древесины для получения сахаров при их последующем сбраживании с получением этанола. Поскольку кислотный способ имел определенные недостатки (относительно невысокая степень конверсии сырья, образование токсичных ко-продуктов, накопление неутилизируемых отходов), сахара предлагалось получать с помощью ферментативного гидролиза после соответствующей предобработки ВРС.

С начала 1980-х годов большое внимание в исследованиях кафедры химической энзимологии, проводимых в дальнейшем совместно с Институтом биохимии им. А.Н. Баха, уделялось практическому решению проблемы переработки целлюлозы в сахара. Проводились исследования, посвященные выбору ФП, целлюлозосодержащего сырья и способа его предобработки [49], дозировке ФП, повторному использованию (рециклу) ферментов [50–52], изучению явления стабилизирующего действия на ферменты полисахаридных субстратов [53–55], влияния ингибирования продуктами гидролиза [56], а также токсичными веществами, образующимися в результате предобработки ВРС [57], негативному влиянию адсорбции целлюлолитических ферментов на лигнине и инактивации целлюлаз лигнином [58], структурной неоднородности целлюлозного субстрата и изменения (уменьшения) его реакционной способности в ходе ферментативного гидролиза [27, 59, 60]. Кроме того, осуществлялись исследования по выбору типа (конструкции) реактора для аппаратурного оформления процесса ферментативного гидролиза.

С появлением на кафедре химической энзимологии ЭВМ PDP 11/45 для описания кинетики ферментативного гидролиза целлюлозы с учетом различных факторов, влияющих на этот процесс, широко использовалось математическое моделирование, сопровождаемое экспериментальной верификацией результатов (большую роль в развитии этого направления сыграли А.В. Гусаков и Г.Х. Голдштейнс), в том числе для случая осуществления процесса в реакторе периодического типа [61, 62], а также для проточного реактора непрерывного действия колонного типа [63, 64]. Сырьем для этих экспериментов служили стебли хлопчатника после щелочной предобработки, полученные в НИИ химии и технологии целлюлозы (г. Ташкент). Было показано, что в зависимости от условий процесса выигрывает тот или иной тип реактора. В колонном реакторе можно достигнуть более высокой концентрации целлюлозосодержащего субстрата. По степени конверсии субстрата реактор периодического действия превосходит колонный при высокой скорости протока в последнем, но уступает колонному реактору при низкой скорости протока. По концентрации получаемых сахаров реактор периодического действия, как правило, выигрывает, но уступает колонному при низкой скорости протока и высокой дозировке ФП [65–68]. Колонный реактор позволял решить проблему, связанную с ингибированием целлюлаз продуктами гидролиза и регенерацией (повторным использованием) ферментов, кроме того, он позволял осуществлять процесс гидролиза непрерывно в течение продолжительного времени. Однако при реализации длительного процесса выявилась проблема микробной контаминации из-за нарушения условий стерильности процесса.

В 1984 г. медалью ВДНХ был отмечен коллектив ученых МГУ и Института биохимии им. А.Н. Баха за разработку и испытание в стендовых условиях непрерывного процесса ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего сырья в аппарате нового типа – проточном колонном реакторе с авторегенерацией фермента, позволяющем использовать одну и ту же порцию фермента для гидролиза нескольких порций сырья, что существенно удешевляло процесс. Сырьем служили предобработанные стебли хлопчатника, выход сахаров достигал 93% в пересчете на содержание целлюлозы в сырье, продуктивность реактора по сахарам составляла 0,8–1,5 г/л за 1 ч, концентрация сахаров на выходе равнялась 6%, содержание глюкозы составляло 60–80% от всех сахаров. Отметим, что в 1986 г. за разработки в области биоконверсии ВРБ группа исследователей кафедры химической энзимологии и Института биохимии им. А.Н. Баха была удостоена звания лауреатов премии им. Ленинского комсомола в области науки и техники.

В 1990-е годы проводились исследования, направленные на поиск возможностей интенсификации ферментативного гидролиза целлюлозы.

Совместно с кафедрой биофизики физического факультета МГУ (Л.В. Яковенко) процесс гидролиза целлюлозы был осуществлен в постоянном электрическом поле (напряженность поля варьировала от 25 до 200 В/см) в специально сконструированном реакторе, состоящем из двух электродных камер, между которыми находилась рабочая зона реактора [69]. В этом случае использовалось явление электроудерживания (электроадсорбции) ферментов на диэлектрической матрице целлюлозы, что приводило к существенному (по сравнению с процессом в отсутствие поля) концентрированию целлюлаз на поверхности субстрата и соответственно к значительному (в 3–5 раз) увеличению скорости гидролиза по сравнению с действием максимального количества ферментов, которое могло адсорбироваться на целлюлозе в естественных условиях в отсутствие поля. Адсорбционной способностью ферментов можно было манипулировать, меняя напряженность поля, или отключая поле вообще, что приводило к десорбции избытка ферментов. Таким образом, использование явления электроадсорбции целлюлаз не только приводило к интенсификации процесса гидролиза, но и открывало путь к регенерации ферментов [70].

Был создан IMTR-реактор (Intensive Mass Transfer Reactor [71]), в котором реализован сверхинтенсивный процесс гидролиза целлюлозы с использованием энергии электромагнитного поля. Рабочая зона реактора помещалась между двумя плоскими электромагнитными индукторами, в эту зону помимо целлюлозы и целлюлаз вносились ферромагнитные частицы, имеющие игольчатую форму. При подаче питания индуктор создавал в рабочей зоне переменное неоднородное поле, под действием которого ферромагнитные частицы приходили в быстрое хаотичное движение, образуя магнитоожиженный слой и обеспечивая интенсивное перемешивание реакционной смеси, сопровождаемое истиранием целлюлозного субстрата [72]. В результате исчерпывающий гидролиз целлюлозы осуществлялся за 30–60 мин (для сравнения – в реакторе периодического действия обычного типа процесс гидролиза целлюлозы завершался за 24–48 ч). Начальная скорость процесса гидролиза возрастала примерно в 10 раз, а производительность процесса увеличивалась до 46 г/л за 1 ч при завершении процесса в течение 30 мин (до 34 г/л за 1 ч в течение 60 мин) [71]. Эти данные были получены в лабораторном IMTR-реакторе, в дальнейшем он был масштабирован до объема рабочей зоны 50 л.

Осуществлялись исследования по расширению ассортимента ВРС как отечественного, так и зарубежного производства (исходного и прошедшего предобработку), которое можно было использовать для процессов ферментативного получения сахаров. В выбранных стандартными условиях по дозировке и составу ферментного комплекса, концентрации субстрата в реакционной смеси, температуре и pH была определена реакционная способность многих видов отходов сельского хозяйства и пищевой промышленности, а также отходов, вторичных продуктов и полуфабрикатов процессов переработки древесины, производства целлюлозы, фурфурола, ксилита [73, 74]. Всего была проанализирована реакционная способность нескольких сотен видов ВРС (исследования в этом направлении продолжаются и в настоящее время) [75–78].

Проводились разработки, направленные на микробиологическое превращение полученных из ВРС сахаров в этанол с применением как свободных, так и иммобилизованных (за счет адсорбционной иммобилизации на алюмоборосиликатных стекловолокнах) клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [79, 80]. Иммобилизацию клеток дрожжей осуществляли также путем их включения в криогели поливинилового спирта [81]. Кроме того, для получения этанола использовали клетки бактерий *Zymommonas mobilis*, иммобилизованных путем включения в матрицу каррагинанового геля [82]. В случае применения свободных клеток микроорганизмов использовали реактор периодического типа, в случае иммобилизованных – проточный колонный реактор. Продуктивность процесса для иммобилизованных клеток по сравнению со свободными возрастала в 5–10 раз [82]. В дальнейшем с помощью иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта клеток *Clostridium acetobutylicum* был осуществлен процесс получения из гидролизатов ВРБ смеси бутанола, ацетона и этанола [83]. Отметим также, что сахара из ВРС использовали для получения L-лизина с помощью иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта клеток *Corynebacterium glutamicum* [184].

В процессах биоконверсии ВРС применяли иммобилизованные ферменты. Например, ФП Пектофоетидин как источник БГЛ, был ковалентно иммобилизован на аминированном силохроме и использован в проточном колонном

реакторе для превращения целлобиозы в глюкозу [85]. Была достигнута 95%-я конверсия целлобиозы с концентрацией на входе в реактор 60 г/л при времени удерживания в реакторе 30–40 мин. Пектофоетидин, иммобилизованный путем ковалентной пришивки к макропористому аэросилогелю, обеспечивал практически 100%-ю конверсию целлобиозы при концентрации целлобиозы на входе 100 г/л, продуктивность реактора по глюкозе достигала 200 г/л за 1 ч [86]. Иммобилизованный препарат β-амилазы Spezyme BBA применяли для получения мальтозы из кукурузного крахмала (ковалентная иммобилизация на альдегидном силохроме [87]); иммобилизованная на различных носителях глюкоамилаза была использована для получения глюкозы из крахмала [5, 53].

### Создание продуцентов целлюлаз и других карбогидраз, генно-инженерные исследования

В начале 2000-х годов совместно с лабораторией Ю.П. Винецкого (ГосНИИгенетика) были начаты исследования ферментного комплекса гриба *P. canescens* (продуцента гемицеллюлаз). В стандартных условиях, на ростовой среде, содержащей свекловичный жом как единственный источник углерода, *P. canescens* секретирует несколько ферментов – эндо-1,3-β-глюканазу, эндо-1,4-β-ксиланазу, арабиноксилан-арабинофуранозидазу, α-L-арабинофуранозидазу А и β-галактозидазу. Были изучены свойства этих ферментов, выделенных в гомогенном виде [88].

На базе гриба *P. canescens* была создана система экспрессии генов, представляющая собой штамм-реципиент *P. canescens* (ΔniaD), дефектный по гену нитратредуктазы, что позволяло использовать селективные среды, в состав которых входил $NaNO_3$, для скрининга позитивных клонов. Были также созданы универсальные векторы, обеспечивающие экспрессию гомологичных или гетерологичных генов. Эта система позволяла получать мультикопированные штаммы, при использовании которых выход целевых ферментов достигал 70% от общего количества секретируемого белка [89, 90]. Структурные гены целевых ферментов находились под контролем сильных индуцируемых арабинозой промоторов генов ксиланазы (*xylA*), α-L-арабинофуранозидазы (*abfA*) и β-галактозидазы (*bgaS*). Реципиентный штамм *P. canescens* (ΔniaD) был использован для экспрессии ряда генов карбогидраз – гомологичных пектинлиазы (*pelA*), рамногалактуронанлиазы (*rglA*), арабинофуранозидаз (*abfA, abfB2*), ксилоглюканазы (*xegA*), α-галактозидазы (*aglA*); гетерологичных ЦБГI (*cbhI)* и ЦБГII (*cbhII)*, ЭГII (*eglII*) и ЭГIII (*eglIII*) *P. verruculosum*, β-глюкозидазы (*bglI*), инулиназы (*inu1*), эндо-полигалактуроназы (*enpg*) и эндо-1,5-α-арабиназы (*abn*) *A. niger*; ЦБГI (*cbhI*), КсилIII (*xylIII*), β-ксилозидазы (*xylB*), эндо-1,4-β-маннаназы (*manB*) *T. reesei*, а также ряда других генов [91–94]. Были изучены свойства рекомбинантных ферментов, выделенных в гомогенном виде [93, 95–100]. Система экспрессии на базе *P. canescens* представляла интерес как продуцент новых ферментов, однако ее биотехнологический потенциал был ограничен сравнительно низкой продуктивностью – 12–15 г/л внеклеточного белка в культуральной жидкости (КЖ).

С середины 2000-х годов совместно с TNO (Netherlands Organization for Applied Scientific Research, P. Punt) и DNL (Dyadic Netherlands, J. Wery, J. Visser) были начаты исследования комплекса целлюлаз, гемицеллюлаз и сопутствующих ферментов, продуцируемых аскомицетом *Chrysosporium lucknowense* C1 (в дальнейшем – *Myceliophthora thermophila*), выделенным из щелочной почвы Дальнего Востока в ИБФМ РАН в лаборатории О.Н. Окунева. Гриб первоначально привлек внимание тем, что его внеклеточные ферменты проявляли активность при более высокой температуре и в нейтральной области значений pH, в отличие от ферментов, секретируемых большинством известных грибных продуцентов. Это свойство ферментов *C. lucknowense* позволяло более эффективно их использовать как для биоконверсии ВРС, так и в текстильной, целлюлозно-бумажной и других отраслях промышленности, в тех процессах, где к ферментам предъявляются требования с точки зрения высокой термостабильности, а также возможности функционирования при повышенных значениях pH. В результате индуцированного мутагенеза были получены мутантные штаммы *C. lucknowense* с увеличенным уровнем секреции целлюлаз и гемицеллюлаз. Было установлено, что в состав ансамбля внеклеточных ферментов гриба входят ЦБГI и ЦБГII, шесть различных ЭГ, шесть ксиланаз, ксилоглюканазы, эндо-1,4-β-маннаназа, экзо-1,4-β-глюкозидазы. С помощью различных методов белковой хроматографии были выделены все эти ферменты и изучены их свойства [101–107]. В дальнейшем коллегами из TNO и DNL на базе *C. lucknowense* была

создана система экспрессии генов промышленно важных ферментов, был также секвенирован геном этого гриба [108].

Для реализации экономически оправданного процесса биоконверсии ВРС (как и других биотехнологических процессов) принципиально важным является наличие высокоактивных штаммов – продуцентов ферментов, позволяющих получать недорогие ФП. Работа по созданию таких штаммов, как *Trichoderma reesei* (в настоящее время – *Hypocrea jecorina*) и *P. verruculosum*, была начата в середине 1990-х годов объединенными усилиями коллектива исследователей кафедры химической энзимологии МГУ и Института биотехнологии г. Лейпциг (G. Kerns, E. Kude). Штаммы рода *Trichoderma* наиболее широко используются в лабораторной и промышленной практике как источник ферментов для биоконверсии ВРС. Штамм *P. verruculosum* привлек к себе внимание тем, что его целлюлазный комплекс проявлял более высокую активность при осахаривании целлюлозы, чем комплекс *T. reesei*, причем это наблюдалось для разных видов целлюлозосодержащего сырья [109–113], а кроме того, проявлялось в реакторах разного типа действия [114]. Таким образом, целлюлазный комплекс *P. verruculosum* оказался эффективной альтернативой для комплекса *T. reesei* с точки зрения применения в процессах биоконверсии ВРС [115, 116].

Был охарактеризован качественный и количественный состав ансамбля внеклеточных ферментов *T. reesei* TW1, представленного базовым комплексом целлюлаз, состоящим из ЦБГI, ЦБГII и трех ЭГ, а также других ферментов – трех эндо-1,4-β-ксиланаз, полигалактуроназы, ксилоглюканазы, экзо-1,3-β-глюканазы и др. Были изучены свойства этих ферментов, выделенных в гомогенном состоянии. В результате γ-мутагенеза из исходного штамма *T. reesei* TW1 был получен мутантный штамм TW1-59-27 с увеличенной секреторной способностью целлюлаз и ксиланаз, позволивший получать до 30–35 г/л внеклеточного белка в КЖ [117]. Был также получен мутантный штамм *T. reesei* Co-44 с делетированной ЦБГI (мажорным компонентом секретируемого ансамбля ферментов), за счет чего была существенно увеличена продукция ЭГ, ксиланаз и пектиназ [118–120]. Была проведена оптимизация состава питательной среды и условий процесса культивирования мутантных штаммов в ферментерах. Ферментацию осуществляли по двухстадийной схеме – на первой (короткой) фазе процесса происходил рост биомассы гриба (основу питательной среды составляли целлюлоза и глюкоза); вторая, более длительная фаза, предусматривает подпитки лактозой, глюкозой и ксилозой, на этой фазе осуществляется биосинтез внеклеточных ферментов. Использование глюкозы на обеих фазах процесса ферментации стало возможным вследствие того, что в результате мутагенеза была снижена катаболитная репрессия гриба. Индуктором биосинтеза целлюлаз служила лактоза, а биосинтеза ксиланаз – ксилоза.

В случае *P. verruculosum* WA30 также был охарактеризован по составу ансамбля внеклеточных ферментов (в него входили ЦБГI и ЦБГII, различные ЭГ, БГЛ, ксиланаза, ксилоглюканазы, глюкоамилаза и др.), которые были выделены в гомогенном состоянии. Были изучены свойства этих ферментов [121–124]. Сравнительное изучение ферментов *P. verruculosum* и *T. reesei* позволило установить, что одной из причин более высокой эффективности целлюлазного комплекса *P. verruculosum* при осахаривании целлюлозы является более высокая удельная активность входящих в его состав ферментов (в первую очередь ЦБГI и ЦБГII); кроме того, в состав секретируемых ферментов *P. verruculosum,* в отличие от *T. reesei,* входит БГЛ [125].

В результате нескольких циклов индуцированного мутагенеза с последующей селекцией [126] из дикого штамма *P. verruculosum* WA30 был получен высокопродуктивный штамм *P. verruculosum* B221-151, секреторная способность которого составила 50–60 г/л внеклеточного белка. Биосинтез целлюлаз этого штамма индуцируется целлюлозой и целлоолигосахаридами [127], катаболитная репрессия снижена. Была проведена оптимизация состава питательной среды и условий процесса культивирования мутантного штамма в ферментерах. Основу питательной среды составили целлюлоза и глюкоза. Как и в случае *T. reesei*, процесс ферментации *P. verruculosum* B221-151 осуществляется по двухстадийной схеме, вторая стадия предусматривает подпитки глюкозой и целлюлозой [128].

Из штамма *P. verruculosum* B221-151 путем мутагенеза был получен реципиентный штамм *P. verruculosum* B1-537 (Δ*niaD*) и создана система экспрессии, позволяющая легко трансформировать реципиентный штамм экспрессионными конструкциями, содержащими целевые гетерологичные или гомологичные гены, функционально связанные с промотором и терминатором сильного индуцибельного промотора гена мажорного секреторного белка ЦБГI (*cbh1*).

Реципиентный штамм *P. verruculosum* B1-537 (Δ*niaD*) характеризуется высокой секреторной способностью (до 60 г/л внеклеточного белка в КЖ), обеспечивает высокий уровень экспрессии целевых генов и высокий уровень секреции синтезируемых целевых ферментов. Полученные с помощью рекомбинантных штаммов ФП содержат 30–70% целевых рекомбинантных ферментов (в некоторых случаях – до 80%) от общего пула белка, причем «чужеродные» рекомбинантные ферменты не подвержены протеолизу [129].

Особенность рекомбинантных штаммов *P. verruculosum* состоит в стабильной интеграции экзогенной ДНК в хромосому реципиентного штамма, что не приводит к потере целевой активности при их пассажировании. Генетическую трансформацию реципиентного штамма можно осуществлять одновременно несколькими векторными конструкциями. В результате стандартизации таких параметров, как состав питательной среды и условия культивирования рекомбинантных штаммов (продуцентов различных целевых ферментов), была отработана простая и надежная технология первичного отбора позитивных трансформантов на агаризованных средах, а также вторичного и последующего циклов отбора при их культивировании в качалочных колбах и ферментерах. Затраты времени на получение продуцента целевого фермента, от постановки задачи до получения рекомбинантного штамма (продуцента), составляют от 3 до 6 месяцев [130].

Использование возможностей экспрессионной системы *P. verruculosum* позволило изменять содержание тех или иных ферментов (входящих в состав базового целлюлазного комплекса, а также вспомогательных) и вносить в состав секретируемого комплекса новые ферменты. Были созданы рекомбинантные штаммы, позволяющие получить ФП, существенно обогащенные теми или иными индивидуальными ферментами – различными ЦБГ или ЭГ, ксиланазами, маннаназой, пектиназами, целлобиазой, и др. [130, 130]. Это обеспечило широкие возможности для варьирования и оптимизации состава мультиэнзимных ФП в целях достижения максимальной эффективности процессов биоконверсии различных по происхождению и составу видов ВРС (подвергнутых разнообразным видам предобработки) [91, 132–135]. Были также получены рекомбинантные штаммы (продуценты двух или нескольких целевых ферментов), что позволило в результате однократно проведенного процесса культивирования получить сбалансированный мультиферментный комплекс, содержащий как базовые (ЦБГ и ЭГ), так и вспомогательные ферменты (БГЛ, ксиланаза и других) для конверсии ВРС. Создание таких штаммов было осуществлено при одновременном использовании «сильного» (*cbh1)* промотора, а также других, более «слабых» промоторов – индуцибельного промотора гена глюкоамилазы (*gla1*) и конститутивного гистонового промотора (*hist4)*. В результате были получены ФП, содержащие относительно небольшое количество вспомогательных ферментов (10–20% от общего содержания белка), при этом практически не была нарушена целостность и сбалансированность базового целлюлазного комплекса [130, 136–139].

В итоге созданные с использованием системы экспрессии *P. verruculosum* штаммы-продуценты позволили получить ФП, обеспечивающие более высокую эффективность процессов осахаривания ВРС по сравнению с коммерчески доступными ФП, специально разработанными для ферментативной конверсии ВРС и выпускаемыми ведущими биотехнологическими компаниями «Novozymes» и «DuPont/Danisco» (Cellic CTec-1, Cellic CTec-2, Accelerase 1000, Accelerase 1500, Accelerase XY, Accelerase DUET) [130, 140].

Создание штаммов – продуцентов различных ферментов, предназначенных для биоконверсии ВРС, существенно облегчило процедуру их наработки в гомогенном виде в препаративном количестве. Это позволило провести цикл исследований, в которых различные мультиферментные композиции формировались на базе гомогенных ферментов, что создало возможность тщательной юстировки состава мультиэнзимных композиций, адаптированных по качественному и количественному составу для достижения максимальной эффективности процесса биоконверсии различных видов ВРС [141, 142]). Например, было показано, что оптимальный ферментный комплекс для гидролиза МКЦ состоит из ЦБГIа, ЦБГIв, ЦБГII, ЭГII, ЭГV, БГЛ и ксиланазы в соотношении 1:1:2:0,3:0,4:0,2:0,1; оптимальный комплекс для гидролиза предобработанной органозольвом древесины пихты состоит из ЦБГIа,, ЦБГII, ЭГII и БГЛ в соотношении 2:2:0,8:0,2 [130]. Ферментный комплекс, позволивший осуществить практически 100%-ю конверсию свекловичного жома содержит ЦБГ, ЭГ, БГ, арабиноксилан-арабинофурангидролазу, пектинлиазу, полигалактуроназу (основные ферменты), а также эндо- или экзо-арабиназы, эндогалактаназу, β-ксилозидазу, эндо-ксиланазу и/

или α-арабинофуранозидазу (вспомогательные ферменты) [141]. Далее осуществляется воспроизводство оптимального соотношения ферментов комплекса, но уже с использованием ФП, получение которых реализуется за счет создания с помощью генно-инженерных методов соответствующих рекомбинантных штаммов-продуцентов. Следует отметить важную роль, которую сыграла система экспрессии *P. verruculosum* для исследования свойств Cu-зависимой литической полисахаридмонооксигеназы (ЛПМО) – открытого в 2010-е годы фермента негидролитической природы, играющего важную роль в деструкции целлюлозы [125]. ЛПМО разрушает кристаллические участки целлюлозы по окислительному механизму, порождая точки атаки для ЦБГ, что способствует процессу гидролитического получения сахаров (возвращаясь к изложенной выше $C_1$–$C_x$-концепции Э. Риза можно полагать, что ЛПМО играет роль негидролитического $C_1$-фермента). Сложность в изучении свойств ЛПМО и его роли в деструкции целлюлозы состояла в отсутствии селективных методов определения активности фермента. Кроме того, содержание ЛПМО в составе целлюлазных ФП, как правило, невелико, что затрудняет получение ЛПМО в гомогенном виде. Создание рекомбинантных штаммов *P. verruculosum* (продуцентов гомологичной и гетерологичной ЛПМО) привело к получению ФП с содержанием ЛПМО 20–60% от общего пула белка [143, 144], что позволило наработать значительное количество гомогенных ЛПМО из различных микроорганизмов, осуществить детальное изучения их свойств, а также создать метод определения активности ЛПМО [145–150].

Подводя итог исследованиям в области биоконверсии ВРС, можно констатировать, что к настоящему времени за счет использования возможностей экспрессионной системы *P. verruculosum* для получения высокоактивных целлюлолитических ФП, на основании результатов оптимизации состава мультиферментных комплексов, адаптированных к различными видам ВРС, благодаря развитию существующих и возникновению новых методов предобработки сырья, тщательному выбору конкретных его видов (включая высоко реакционноспособные целлюлозосодержащие полуфабрикаты и вторичные продукты промышленности и сельского хозяйства) удается осуществить процессы получения сахаров С6 и С5 со степенью конверсии сырья от 75 до 90% (от а.с.в.) при его высокой концентрациии в реакционной смеси (до 300 г/л) и относительно низких дозировках ФП [76, 78, 151–154].

## Практическое применение целлюлаз и других карбогидраз

На кафедре химической энзимологии, начиная с 1990-х годов, активно проводились исследования, направленные на применение ферментов в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства.

***Текстильная промышленность.*** Компания «Dyadic International, Inc.» (США, M. Emalfarb, M. Baez) инициировала цикл исследований, направленных на поиск целлюлаз, наиболее адаптированных к применению в текстильной промышленности. Необходимо было решить задачу, «обратную» традиционной для целлюлаз. Для глубокой и эффективной биоконверсии ВРС требуется применение агрессивных по отношению к целлюлозе ферментов. Напротив, целлюлазы, используемые для обработки хлопчатобумажной ткани и изделий из нее, не должны приводить к заметному разрушению целлюлозной матрицы, но при этом должны способствовать достижению требуемых потребительских свойств, например удалению ворсинок и микродефектов (биополировка хлопчатобумажной ткани), увеличению гидрофильности ткани (биоотварка), частичному удалению индиго из джинсовой ткани (депигментация), удалению красящих тонеров и чернил при вторичной переработке бумаги (деинкинг) и т.д. В работах [155–157] были проанализированы около 30 лабораторных и коммерческих целлюлазных ФП с точки зрения их способности к глубокой деструкции целлюлозы («сахаролитическая» активность), а также депигментации джинсовой ткани и удалению тонеров с поверхности бумаги («тополитическая» активность). Была выявлена большая группа ФП, которые обладают высокой «сахаролитической», но низкой «тополитической» активностью и только некоторые ФП проявляли высокую «тополитическую» активность при низкой «сахаролитической». Дальнейшие исследования с использованием различных гомогенных ЭГ и ЦБГ показали, что за тополитическую активность ФП отвечают ЭГ, не имеющие целлюлозосвязывающего модуля, причем лучшими «тополитиками» являются те из них, которые имеют на поверхности молекул кластеры гидрофобных аминокислот, ответственные за связывание частиц индиго или тонеров, что придает действию таких ферментов дополнительный эмульсифицирующий эффект, препятствующий ресорбции

частиц красителя или тонера на поверхности целлюлозной матрицы [158, 159].

***Целлюлозно-бумажная промышленность.*** Было установлено, что ЭГ оказывают позитивное влияние на процесс изготовления бумаги, это происходит за счет модификации волокон целлюлозы, снижения затрат энергии, ускорения процесса размола технической целлюлозы и улучшения ее бумагообразующих свойств. Однако чрезмерное воздействие целлюлаз, особенно ЦБГ, на целлюлозное волокно может вызывать снижение его прочности и связующей способности, что приводит к уменьшению прочности бумаги [160].

Традиционные коммерческие целлюлазные ФП имеют высокое содержание ЦБГ (60% и выше от общего белка), т.е. эти ФП являются агрессивными по отношению к целлюлозному волокну и приводят к его разрушению; для обработки волокна следует использовать ФП, обогащенные ЭГ, с уменьшенным содержанием ЦБГ. В этих целях был создан высокоактивный рекомбинантный штамм *P. verruculosum* – продуцент гомологичной ЭГII, позволивший получить ФП, содержащий около 60% ЭГII (и только 25% ЦБГ), который был успешно применен для модификации беленой сульфатной целлюлозы, предназначенной для производства бумаги [161]. Основной эффект, вызываемый биокаталитическим действием ЭГII, заключается в деструкции верхних слоев целлюлозных волокон, увеличению их наружной поверхности и степени фибрилляции.

***Нефтедобыча.*** Интенсификацию добычи нефти и природного газа осуществляют с помощью технологии гидроразрыва пласта (ГРП), применяя водные растворы веществ, обладающих высокой вязкостью, для чего используются природные полисахариды, в том числе галактоманнан (гуаровая камедь). Вязкость бурового раствора непосредственно после реализации его функции и завершения операции ГРП должна быть уменьшена *in situ* в стволе скважины путем осуществления деструкции галактоманнана (традиционно для этого применяют сильные окислители и другие агрессивные агенты, оказывающие, помимо прочего, негативное влияние на окружающую среду). Чтобы обеспечить экологически безопасную технологию ГРП для деструкции галактоманнана, целесообразно применять обработку маннаназами, уменьшающими его вязкость. В этих целях был создан рекомбинантный штамм *P. verruculosum* – продуцент гетерологичной эндо-1,4-β-маннаназы *T. reesei,* с помощью которого был получен ФП с содержанием маннаназы около 60% от общего пула белка [106]. Этот ФП обладал маннан-деполимеразной активностью [162], приводящей к потере вязкости растворов субстрата, гидролитическая активность маннаназы наблюдалась в широком диапазоне pH (от 3 до 9,5) и температуры (20–90 °C) с оптимумами при pH 4,5–7,5 и 60–75 °C соответственно. Опытные партии ФП маннаназы были выпущены на заводе «Агрофермент» и успешно прошли испытания, в которых зарекомендовали себя как эффективные деструкторы галактоманнана в составе жидкостей для ГРП.

***Охрана окружающей среды.*** Мицелиальные грибы занимают лидирующую позицию в качестве объектов биотехнологического производства. В качестве промышленных продуцентов наиболее часто используют грибы родов *Aspergillus, Penicillium* и *Trichoderma*. В результате ферментации в качестве отхода образуется большое количество грибного мицелия, который не подлежит длительному хранению и является источником загрязнения окружающей среды; наиболее распространенным способом его утилизации является сжигание [131]. Клеточная стенка мицелиальных грибов состоит из гликопротеинов и полисахаридов. Глюканы являются основным структурным полисахаридом клеточной стенки (примерно 50–60% по сухой массе), от 65 до 90% из них приходится на долю β-1,3-глюкана. Хитин (линейный полимер β-1,4-N-ацетил-D-глюкозамина) также относится к структурно важным компонентам клеточной стенки грибов. В клеточных стенках мицелиальных грибов в той или иной форме содержатся полимеры β-D-маннозы. Соотношение хитина, глюканов и маннанов может меняться для разных родов и видов грибов, а также зависеть от состава среды культивирования [163].

Для осуществления экологически и экономически оправданного способа переработки грибного мицелия как отхода микробиологической промышленности весьма перспективным представляется способ ферментативной деструкции полисахаридов его клеточной стенки. Были созданы [164] рекомбинантные штаммы *P. verruculosum* – продуценты гетерологичных эндо-1,4-β-хитиназы, эндо-1,3-β-глюканазы (ламинариназы) *M. thermophila*, а также эндо-1,4-β-маннаназы *T. reesei*, позволившие получить ФП с содержанием хитиназы, ламинариназы и маннаназы 30, 40 и 60% соответственно. Обработка мицелия *P. verruculosum* и *A. awamori* этими

(индивидуальными) ФП приводила к уменьшению его объема в 1,8–2,7 раза, причем для *P. verruculosum* ключевую роль сыграла ламинариназа, для *A. awamori* – хитиназа. Использование смесевого ФП ламинариназы и хитиназы привело дополнительно к уменьшению в 2 раза объема мицелия для обоих грибов, добавление к смесевому препарату ламинариназы и хитиназы ФП маннаназы уменьшило объема осадка еще на 30–40% [165].

Большинство бактерий в естественных условиях существует в виде биопленок – сообщества микроорганизмов, представляющих собой клетки, прикрепленные друг к другу и заключенные в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ. Способность бактерий объединяться в организованные сообщества (биопленки) и таким образом защищаться от неблагоприятных факторов внешней среды является основной причиной неэффективности антибактериальных препаратов (как антибиотиков, так и бактерицидных и дезинфицирующих средств). Бактерии объединяются в сообщество благодаря гиперсинтезу экзоклеточного полисахаридного матрикса, основным компонентом которого являются гомо- и гетерополисахариды. В их состав входят глюкуроновые кислоты, аминосахара, целлюлоза, альгинаты, декстраны и др., в состав биопленок входят также белки, липиды и ДНК.

Возможным подходом к уничтожению бактерий в состоянии биологической пленки может быть применение ферментов, способных разрушать полисахариды матрикса и тем самым освобождать бактерии от протекторного барьера для проведения уничтожения или диагностирования. Были созданы рекомбинантные штаммы *P. verruculosum* – продуценты карбогидраз, разрушающих полисахариды матрикса биопленки и гетерологичных альгинатлиазе *A. oryzae* (расщепляющей гликозидные связи между α-L-гилуронатом и β-D-манууроном альгинатов по механизму β-элиминирования), эндо-1,3-α-глюканазе (мутаназе) и эндо-1,6-β-глюканазе (пустуланазе) *T. harzianum*, а также эндо-1,6-α-декстраназе *P. funiculosum* [166, 167]. Были получены ФП с содержанием целевых ферментов от 30 до 60% от общего пула белка. Совместно с ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» и ООО «БФР Лабораториз» были проведены испытания этих ФП (использованных индивидуально или в различных сочетаниях) по разрушению биопленок клинических изолятов грамположительных и грамотрицательных патогенных бактерий *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumanii, Klebsiella pneumoniae* и *Salmonella typhimurium.* Была показана 85–90%-я эффективность этих ФП в разном сочетании в отношении разрушения как свежих (молодых) так и старых (сухих) биопленок при их образовании на абиотических поверхностях [168, 169]. В ООО «БФР Лабораториз» были созданы моющие средства («Энзимикс», «Энзимикс Мико» и «Энзимкс Про») на основе мультиферментных композиций из указанных выше ФП, а также дополнительных функциональных и технологических компонентов, которые обеспечивают высокую дезинфицирующую активность и моющую способность обрабатываемых материалов. Опытные партии ФП «Энзимикс» были произведены на заводе «Агрофермент».

***Пищевая промышленность.*** Проводились исследования по созданию продуцентов амилаз и других карбогидраз для получения ФП, применяемых в спиртовой, крахмалопаточной и хлебопекарной промышленности. С помощью индуцированного мутагенеза (УФ-, γ- и химического мутагенеза) и последующей селекции, совместно с коллективом исследователей из ВНИИПБТ, возглавляемого Н.В. Цуриковой, были получены высокоактивные штаммы – продуценты термостабильной α-амилазы (*Bacillus licheniformis* [170]), глюкоамилазы (*A. awamori* [171–173]), мальтогенной α-амилазы (*A. oryzae* [174]), ксиланаз и пектиназ (*A. japonicus* [175]). На базе мутантного штамма *A. awamori* Co-6804 была создана система экспрессии *A. awamori* (ΔniaD) с использованием промотора и терминатора сильного глюкоамилазного промотора (*glaA*), индуцируемого мальтоолигосахаридами. Был также создан реципиентный штамм *A. awamori*, несущий ген амилазного активатора (*amyR) A. niger.* Использование этой системы экспрессии позволило добиться дальнейшего увеличения продуктивности штамма по глюкоамилазе, а также получить штаммы – продуценты одновременно глюкоамилазы и ферментов, разрушающих некрахмальные полисахариды (НПС), что увеличивает эффективность применения глюкоамилазы при осахаривании крахмалистого сырья [176, 177]. Отметим, что в конце 1990-х – начале 2000-х годов мутантные штаммы (продуценты глюкоамилазы) были использованы для производства фермента спиртовыми цехами Мичуринского экспериментального завода,

АО «Тамбовское спиртовое предприятие «Талвис», ОАО «Спиртовый комбинат» (г. Мариинск) и другими предприятиями спиртовой отрасли.

Ферменты широко используются в технологических процессах, направленных на производство соков и вин. Клеточные стенки плодово-ягодного сырья (помимо целлюлозы и гемицелюллоз) характеризуются высоким содержанием пектинов, что существенно затрудняет сокоотдачу. Коммерческие ФП, используемые для обработки плодово-ягодного сырья, обычно имеют высокое содержание пектолитических ферментов, но обладают низкой активностью по отношению к гемицеллюлозе и целлюлозе. Однако для эффективного разрушения полисахаридов клеточной стенки необходимо применять ФП, сбалансированные по содержанию пектиназ, гемицеллюлаз и целлюлаз. С использованием экспрессионной системы *P. verruculosum* был создан продуцент гетерологичных пектин-лиазы *P. canescens* и эндо-1,4-α-полигалактуроназы *A. niger*, позволивший получить ФП, содержащие до 30% пектиназ от общего пула белка, а также целлюлазы и гемицеллюлазы, входящие в состав комплекса секреторных ферментов *P. verruculosum*. Кислая Ca-независимая пектинлиаза проявляла высокую активность к высокоэтерифицированному пектину [178], полигалактуроназа – к низкоэтерефицированному. Использование рекомбинантных ФП позволило существенно (на 15–300%) повысить выход сока из различных видов плодово-ягодного сырья (калины, шиповника, боярышника, клубники) и улучшить его качество – увеличить содержание экстрактивных веществ (до 1,7 раза), аскорбиновой кислоты (до 3,8 раза), полифенольных соединений (до 1,5 раза), а также увеличить антиоксидантную емкость (до 4,3 раза) [131, 178, 179].

Был создан рекомбинантный штамм *P. verruculosum* с увеличенной продукцией гетерологичных пектинлиазы *P. canescens* и БГЛ *A. niger*. ФП, полученный с помощью этого штамма, был использован для изготовления в лабораторных условиях столовых плодово-ягодных вин (из винограда, рябины, черной смородины и сливы), в технологию получения которых была включена стадия мацерации под действием ферментов. Удалось увеличить выход сусла из винограда и из плодовой мезги, получить легко осветляемые вина с меньшим содержанием летучих кислот, увеличенным выходом ароматобразующих и красящих веществ, и в результате улучшить органолептические характеристики столовых вин [180, 181].

Переработка сельскохозяйственных растений в целях получения разнообразных продуктов и физиологически активных веществ является важным направлением пищевой промышленности. В этом отношении внимания заслуживают топинамбур, цикорий, артишок и другие растения, ценным компонентом которых является полисахарид инулин (β-2,1-полифруктан, у которого на невосстанавливающем конце полимерной молекулы находится остаток глюкопиранозы). Например, в клубнях топинамбура содержание инулина достигает 80%. Инулин является сырьем для производства кристаллической фруктозы и фруктозных сиропов, фруктоолигосахаридов (ФОСы – пребиотики), лимонной, молочной и фумаровой кислот, а также биотоплива (биоэтанола и биобутанола).

Важнейшим этапом переработки инулина в полезные продукты является его ферментативная конверсия в моносахариды (фруктозу и глюкозу) под действием экзо-2,1-β-инулиназы. Был создан рекомбинантный штамм *P. verruculosum* – продуцент гетерологичной экзо-2,1-β-инулиназы I *A. awamori*, с помощью которого были получены высокоактивные ФП с содержанием экзоинулиназы до 34% от общего пула белка. Такие ФП позволяют в течение менее 3 ч осуществить количественную конверсию клубней топинамбура и получить продукт с содержанием фруктозы и глюкозы в соотношении примерно 3:1 [131, 182]. Были изучены свойства экзоинулиназы, выделенной в гомогенном состоянии. Помимо активности по отношению к инулину фермент проявляет высокую сахаразную (инвертазную) и α-галактозидазную активность (осуществляет гидролиз олигосахаридов сои – стахиозы и раффинозы) [183]. Кроме того, был создан штамм *P. verruculosum* – продуцент гетерологичной эндо-2,1-β-инулиназы *A. niger*, позволивший получить высокоактивный ФП эндоинулиназы и осуществить процесс получения ФОС из инулина и клубней топинамбура [107, 184]. Отметим, что опытные партии ФП экзоинулиназы и эндоинулиназы под названием «Топилаза Экзо» и «Топилаза Эндо» были произведены на заводе «Агрофермент».

***Кормовые добавки.*** Зерно злаковых культур, широко используемое для производства кормов в животноводстве и птицеводстве (пшеница, рожь, овес, ячмень), помимо питательных веществ (крахмал, белки) содержит также от 13 до 15% НПС, таких как целлюлоза, β-глюканы и ксиланы (пентозаны). НПС являются антипитательными веществами, они оказывают

отрицательное воздействие на усвоение кормов за счет набухания и образования гелеобразных субстанций, которые затрудняют доступ пищеварительных ферментов к питательным веществам и массообмен в кишечнике. Моногастричные животные и птица не имеют собственных ферментов, способных эффективно расщеплять НПС, поэтому в кормопроизводстве в качестве добавок используют ФП, в состав которых входят целлюлазы, β-глюканазы и ксиланазы, что позволяет снизить вязкость содержимого кишечника и повысить усвояемость питательных веществ за счет ферментативного расщепления НПС.

Следует отметить, что практическое применение различных российских промышленных ФП в качестве кормовых добавок предпринимались на кафедре химической энзимологии еще в 1990-е годы [185–187]. Исследования в этой области не прекращались и впоследствии [188–190]. На заводе «Агрофермент», начиная с 2014 г., было налажено производство целлюлазных и ксиланазных кормовых ФП, полученных на базе мутантных штаммов *T. reesei* (коммерческие названия продуктов – «Агроцелл» и «Агроксил»). С использованием системы экспрессии *P. verruculosum* были созданы рекомбинантные штаммы – продуценты НПС-активных ферментов [191]. В качестве последних были выбраны гетерологичная ЭГI *T. reesei,* гомологичная ЭГII и гетерологичная эндо-β-1,4-ксиланаза E *P. canescens*. ЭГI характеризуется высокой активностью по отношению к целлюлозе, β-глюкану, ксилану и ксилоглюкану, ЭГII – к целлюлозе и β-глюкану, ксиланаза E – по отношению к ксиланам, причем белковые ингибиторы ксиланаз из злаков (типа TAXI, XIP и др.) не влияют на активность последней [192, 193]. Эти ферменты обладают высокой термостабильностью, что важно для сохранения их активности при повышенной температуре в процессе гранулирования комбикормов – необходимой стадии современного кормопроизводства, позволяющей облегчить кормление, снизить потери корма, уничтожить вредные микроорганизмы [194, 195].

В результате одновременной трансформации реципиентного штамма *P. verruculosum* плазмидами, несущими гены *egl1* и *egl2*, был получен штамм – продуцент ЭII и ЭГII, предназначенный для деструкции целлюлозы и β-глюканов, с использованием которого «Агрофермент» в настоящее время производит ФП «Агроцелл Плюс». При трансформации плазмидой, несущей ген *xylE*, был получен штамм-продуцент ксиланазы E, который стал основой для производства ФП «Агроксил Плюс», предназначенного для деструкции ксиланов. Одновременная трансформация реципиентного штамма плазмидами, несущими гены *egl2* и *xylE*, привела к созданию штамма – продуцента ЭГII и ксиланазы E и получению ФП «Агроксил Премиум» для деструкции β-глюканов и ксиланов [191, 196]. Содержание эндо-деполимераз, разрушающих НПС в рекомбинантных ФП, составило от 44 до 68% [191, 197]. Были проведены исследования по оптимизации состава питательной среды и условий культивирования рекомбинантных штаммов в ферментерах, что позволило повысить уровень целевой активности в КЖ [128].

НПС-активные ФП проявляют активность в широком диапазоне pH и температуры, в том числе при физиологическом значении этих параметров (pH 3–7; 37–38 °C), характеризуются высокой стабильностью при воздействии пищеварительных протеаз (пепсина и трипсина), а также высокой термостабильностью. «Агроцелл Плюс», «Агроксил Плюс» и «Агроксил Премиум» находят успешное применение для кормления цыплят-бройлеров и поросят [198–200].

Раффиноза и стахиоза, присутствующие в сое и других бобовых, используемых в качестве компонентов кормов животных и птицы, практически не усваиваются организмом животных (соя содержит до 6% галактоолигосахаридов – раффинозы, стахиозы и др.). Галактоолигосахариды являются антипитательным фактором, поскольку сбраживаются микрофлорой кишечника, что приводит к образованию газов и диарее. Решить эти проблемы позволяет использование в качестве кормовой добавки ФП, содержащих α-галактозидазу, осуществляющую гидролиз галактоолигосахаридов [96]. Был создан высокоактивный рекомбинантный штамм *P. verruculosum* – продуцент гетерологичной α-галактозидазы C *A. niger*, позволивший получить ФП с содержанием α-галактозидазы 39–40% от общего пула белка. Кроме того, в качестве источника α-галактозидазы можно использовать ФП экзоинулиназы «Топилаза Экзо», проявляющий, как указано выше, высокую активность по отношению к галактоолигосахаридам сои [183].

Таким образом, использование возможностей экспрессионной системы *P. verruculosum* позволило получить широкий круг продуцентов промышленно важных ферментов карбогидраз [130, 131]. Необходимо подчеркнуть, что

рекомбинантные штаммы *P. verruculosum* (продуценты различных целевых ферментов и мультиферментных комплексов) успешно используются как для получения лабораторных ФП, так и для промышленного производства технических ФП на заводе «Агрофермент», находящих применение в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1.Березин И.В., Клёсов А.А., Рабинович М.Л. // Биоорг. химия. 1976. Т. 2. № 5. С. 680.
2. Рабинович М.Л., Клёсов А.А., Березин И.В. // Биоорг. химия. 1976. Т. 2. № 5. С. 689.
3. Клёсов А.А., Рабинович М.Л., Березин И.В. // Биоорг. химия. 1976. Т. 2. № 6. С. 795.
4. Рабинович М.Л., Клёсов А.А., Березин И.В. // Биоорг. химия. 1977. Т. 3. № 6. С. 405.
5. Синицын А.П., Клибанов А.М., Клёсов А.А., Мартинек К. // Прикл. биохим. и микробиол. 1978. Т. 15. Вып. 2. С. 236.
6. Klyosov A.A., Gerasimas V.B. // Biochimica and Biophysica Acta. 1979. 571. P. 162.
7. Фениксова Р.В. Гидролитические ферменты микроорганизмов и их применение в народном хозяйстве. М., 1972.
8. Reese E.T., Siu R.G.H., Levinson H.S. // J. Bacteriol. 1950. Vol. 59. N 4. P. 485.
9. Miller G.L., Blum R., Hamilton N.F. // J. Chromatog. 1960. Vol. 3. P. 576.
10. Reese E.T., Cilligan W. // Arch. Biochem. Biophys. 1953. Vol. 45. P. 74.
11. Selby K. / Reese E.T. (ed.). Advances in enzymatic hydrolysis of cellulose and related materials. N.Y., 1963. P. 33.
12. Клёсов А.А., Рабинович М.Л., Синицын А.П., Чурилова И.В., Григораш С.Ю. // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. № 8. С. 1225.
13. Клёсов А.А., Рабинович М.Л., Чурилова И.В., Синицын А.П., Григораш С.Ю., Тихонова Т.В., Малиновская Л.М. // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. № 9. С. 1377.
14. Клёсов А.А., Григораш С.Ю. // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. № 10. С. 1538.
15. Klyosov A.A., Sinitsyn A.P., Rabinowitch M.L. // Enzyme Engineering. 1980. Vol. 5. P. 153.
16. Рабинович М.Л., Клесов А.А., Черноглазов В.М. и др. // ДАН СССР. 1981. Т. 260. № 6. С. 1481.
17. Клёсов А.А. // Биоорг. Химия. 1982. Т. 8. №5. С. 643.
18. Рабинович М.Л., Клёсов А.А., Григораш С.Ю., Калинина И.А., Черноглазов В.М. // Биоорг. Химия. 1982. Т. 8. № 1. С. 84.
19. Рабинович Черноглазов В.М., М.Л., Клёсов А.А. // Биохимия. 1983. Т. 48. Вып. 3. С. 369.
20. Черноглазов В.М., Клёсов А.А., Ермолова О.В. // Биохимия. 1983. Т. 48. Вып. 10. С. 1617.
21. Клёсов А.А., Черноглазов В.М., Рабинович М.Л., Глазов М.В., Адаменкова М.Д. // Биохимия. 1983. Т. 48. № 9. С. 1411.
22. Клёсов А.А., Митькевич О.В., Синицын А.П., Березин И.В. // ДАН СССР. 1984. Т. 277. № 4. С. 999.
23. Клёсов А.А., Чурилова И.В. // Биохимия. 1980. Т. 45. Вып. 9. С. 1685.
24. Березин И.В., Рабинович М.Л., Синицын А.П. // Биохимия. 1977. Т. 42. № 9. С. 1631.
25. Синицын А.П., Клёсов А.А. // Биохимия. 1981. Т. 46. № 2. С. 202.
26. Синицын А.П., Наджеми Б., Клёсов А.А. // Прикл. биохим. и микробиол. 1981. Т. 17. Вып. 3. С. 315.
27. Синицын А.П., Наджеми Б., Клёсов А.А. // Химия древесины. 1982. № 2. С. 91.
28. Митькевич О.В., Синицын А.П., Клёсов А.А. // Прикл. биохим. и микробиол. 1985. Т. 21. № 2. С. 213.
29. Синицын А.П., Митькевич О.В., Калюжный С.В., Клёсов А.А. // Биотехнология. 1987. № 1. С. 39.
30. Синицын А.П., Гусаков А.В. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1989. Т. 30. № 2. С. 196.
31. Шевелькова А.Н., Синицын А.П. // Биохимия. 1993. Т. 58. № 10. С. 1548.
32. Шпанченко О.В., Ермолова О.В., Черноглазов В.М. // Биохимия. 1990. Т. 55. Вып. 12. С. 2268.
33. Gusakov A.V. // Biocatalysis. 1988. Vol. 1. P. 301.
34. Черноглазов В.М., Ермолова О.В., Клёсов А.А. // Прикл. биохим. и микробиол. 1989. Т. 25. Вып. 3. С. 333.
35. Klyosov A.A., Ermolova O.V., Chernoglazov V.M. // Biotechnol. Lett. 1988. Vol. 10. N 5. P. 351.
36. Черноглазов В.М., Ермолова О.В., Джафарова А.Н., Клёсов А.А., Гужова Э.П., Логинова Л.Г. // Биохимия. 1988. Т. 53. № 3. С. 475.
37. Черноглазов В.М., Талебаровская И.К., Джафарова А.Н., Клёсов А.А. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 5. С. 631.
38. Chernoglazov V.M., Jafarova A.N., Klyosov A.A. // Anal. Biochem. 1989. 179. P. 186.
39. Chernoglazov V.M., Ermolova O.V., Vozny Ya.V., Klyosov A.A. // Anal. Biochem. 1989. Vol. 182. P. 250.
40. Тихомиров Д.Ф., Столбова В.В., Прабакаран К., Клёсов А.А. // Биотехнология. 1989. Т. 5. № 4. С. 518.
41. Черноглазов В.М., Ермолова О.В., Возный Я.В., Клёсов А.А. // Биотехнология. 1990. № 5. С. 79.
42. Синицын А.П., Клёсов А.А. // Прикл. биохим. и микробиол. 1981. Т. 17. Вып. 5. С. 682.
43. Клёсов А.А., Синицын А.П., Ковалёв Г.В., Калязин Е.П., Бугаенко Л.Т., Березин И.В. // ДАН СССР. 1981. Т. 259. № 6. С. 1495.
44. Синицын А.П., Ковалёв Г.В., Меса-Манреса С.Р., Козловский Д.Ф., Калязин Е.П., Клёсов А.А. // Химия древесины. 1984. № 5. С. 60.
45. Клёсов А.А., Синицын А.П. // Биоорг. Химия. 1981. Т. 7. № 12. С. 1801.
46. Sinitsyn A.P., Gusakov A.V., Vlasenko E.Yu. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1991. Vol. 30. P. 43.

47. Клёсов А.А. // Прикл. биохимия и микробиол. 1985. Т. 21. Вып. 2. С. 269.
48. Sinitsyn A.P., Bungay H.R., Clesceri L.S. // Biotechnol. Bioeng. 1983. Vol. 25. P. 1393.
49. Sinitsyn A.P., Bungay M.L., Clesceri L.S., Bungay H.R. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1983. Vol. 8. P. 25.
50. Clesceri L.S., Sinitsyn A.P., Saunders A.M., Bungay H.R. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1985. Vol. 11. P. 433.
51. Синицын А.П., Власенко Е.Ю., Толстова С.В., Трефилов Э.М., Федоренко Б.Н. // Биотехнология. 1986. № 1. С. 84.
52. Klyosov A.A., Gerasimas V.B., Sinitsyn A.P. // In: Berezin L.B., Klyosov I.V., Wingard A.A. (eds). Enzyme engineering: Future directions. N.Y., 1980. P. 197.
53. Власенко Е.Ю., Синицын А.П., Щербухин В.Д., Клёсов А.А. // Биотехнология. 1985. № 6. С. 76.
54. Синицын А.П., Митькевич О.В., Клёсов А.А. // Прикл. биохим. и микробиол. 1986. Т. 22. Вып. 6. С. 759.
55. Gusakov A.V., Sinitsyna A.P., Gerasimas V.B., Savitskene R.Yu., Steponavichus Yu.Yu. // J. Biotechnol. 1985. Vol. 3. P. 167.
56. Sinitsyn A.P., Clesceri L.S., Bungay H.R. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1982. Vol. 7. P. 455.
57. Клёсов А.А., Черноглазов В.М., Ермолова О.В., Елкин В.В. // Биотехнология. 1985. № 3. С. 106.
58. Синицын А.П., Митькевич О.В., Клёсов А.А. // Биотехнология. 1987. Т. 3. № 5. С. 640.
59. Sinitsyn A.P., Mitkevich O.V., Gusakov A.V., Klyosov A.A. // Carbohydr. Polym. 1989. Vol. 10. P. 1.
60. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Klyosov A.A. // Enzyme and Microb. Technol. 1985. Vol. 7. P. 346.
61. Гусаков А.В., Синицын А.П., Клёсов А.А. // Прикл. биохим. и микробиол. 1986. Т. 22. Вып. 1. С. 59.
62. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Klyosov A.A. // Enzyme and Microb. Technol. 1985. Vol. 7. P. 383.
63. Гусаков А.В., Синицын А.П., Клёсов А.А. // Биотехнология. 1985. № 3. С. 112.
64. Гусаков А.В., Синицын А.П., Клёсов А.А. // Биотехнология. 1986. № 1. С. 74.
65. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Klyosov A.A. // Biotechnol. Bioeng. 1987. Vol. 29. P. 898.
66. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Klyosov A.A. // Biotechnol. Bioeng. 1987. Vol. 29. P. 906.
67. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Manenkova J.A., Protas O.V. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1992. Vol. 34/35. P. 625.
68. Синицын А.П., Ларионова Т.Б., Яковенко Л.В., Березин И.В. // ДАН СССР. 1987. Т. 293. № 2. С. 481.
69. Синицын А.П., Ларионова Т.Б., Яковенко Л.В. // Биотехнология. 1987. № 4. С. 476.
70. Sinitsyn A.P., Gusakov A.V., Davydkin I.Yu., Davydkin V.Yu., Protas O.V. // Biotechnol. Lett. 1993. Vol. 15. N 3. P. 283.
71. Синицын А.П., Гусаков А.В., Давыдкин И.Ю., Давыдкин В.Ю., Протас О.В. // ДАН СССР. 1993. Т. 333. № 4. С. 529.
72. Власенко Е.Ю., Кастельянос О., Синицын А.П. // Прикл. биохим. и микробиол. 1993. Т. 29. № 6. С. 623.
73. Kleim C.R. // Eur. Microbiol. Technol. 1983. Vol. 5. № 2. P. 103.
74. Доценко Г.С., Чекушина А.В., Кондратьева Е.Г., Правильников А.Г., Андрианов Р.М. Осипов Д.О., Синицын А.П., Короткова О.Г., Степанов В.И., Новожилов Е.В., Ачильдиев Е.Р., Константинова С.А., Синицын А.П. // Лесной Вестник. 2012. Т. 8. С. 129.
75. Osipov D.O., Dotsenko G.S., Sinitsyna O.A., Kondratieva E.G., Zorov I.N., Shashkov I.A., Satrutdinov A.D., Sinitsyn A.P. // Agronomy. 2020. Vol. 10. P. 1712.
76. Осипов Д.О., Булахов А.Г., Короткова О.Г., Рожкова А.М., Дуплякин Е.О., Афонин А.В., Середа А.С., Синицын А.П. // Катализ в промышленности. 2016. Т. 16. № 5. С. 75.
77. Доценко Г.С., Осипов Д.О., Зоров И.Н., Синицын А.П. // Катализ в промышленности. 2015. Т. 15. № 5. С. 67.
78. Синицын А.П., Райнина Е.И., Ефремова А.Б., Грачёва И.М., Гернет М.В. // Ферментная и спиртовая промышленность. 1986. № 4. С. 31.
79. Синицын А.П., Райнина Е.И., Ефремова А.Б., Грачёва И.М., Гернет М.В. // Биотехнология. 1986. № 3. С. 66.
80. Varfolomeyev S.D., Rainina E.I., Lozinsky V.I., Kalyuzhny S.V., Sinitsyn A.P., Makhlis T.A., Bachurina G.P., Bokova I.G., Sklyankina O.A., Agafonov E.B. // Proceedings of an International Symposium «Physiology of immobilized cells». Wageningen, The Netherlands, 10–13 December 1989, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (de Bont J.A.M., Visser J., Mattiasson B., Tramper J. eds.) 1990. P. 325.
81. Райнина Е.И., Бачурина Г.П., Махлис Т.А., Синицын А.П., Клёсов А.А. // Биотехнология. 1986. № 4. С. 65.
82. Efremenko E., Stepanov N., Senko O., Nikolskaya A., Maslova O., Zorov I., Sinitsyn A. // Proceedings of the International Conference «19th European Biomass Conference and Exhibition». Berlin, Germany, 6–10 June 2011. P. 1735.
83. Velizarov S.G., Rainina E.I., Sinitsyn A.P., Varfolomeyev S.D., Lozinsky V.I., Zubov A.I. // Biotechnol. Lett. 1992. Vol. 14. N 4. P. 291.
84. Гусаков А.В., Синицын А.П. // Биотехнология. 1987. Т. 3. № 3. С. 2.
85. Гусаков А.В., Синицын А.П., Синельник А.П., Миронюк И.Ф. // Прикл. биохим. и микробиол. 1991. Т. 27. № 6. С. 804.
86. Кравченко Т.И., Гулюк Н.Г., Гусаков А.В., Синицын А.П. // Пищевая промышленность. 1988. № 9. С. 32
87. Синицына О.А., Бухтояров Ф.Е., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Винецкий Ю.П., Синицын А.П. // Биохимия. 2003. Т. 68. № 11. С. 1494.
88. Синицын А.П., Синицына О.А., Федорова Е.А., Окунев О.Н., Соколова Л.М., Винецкий Ю.П., Черноглазов В.М. // Пат. РФ 2358756 С1. 20.06.2009.
89. Винецкий Ю.П., Рожкова А.М., Чулкин А.М., Сатрутдинов А.Д., Синицына О.А., Фёдорова Е.А., Беккаревич А.О., Окунев О.Н., Синицын А.П. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 8. С. 1084.

90. Рожкова А.М., Волков П.В., Кондратьева Е.А., Сатрутдинов А.Д., Рубцова Е.А., Бушина Е.В., Зоров И.Н., Синицына О.А., Синицын А.П., Кошелев А.В., Беккаревич О.А., Бубнова Т.В., Окунев О.Н. // Хранение и переработка сельхозсырья. 2010. № 7. С. 37.
91. Волков П.В., Рожкова А.М., Правильников А.Г., Андриянов Р.М., Доценко Г.С., Беккаревич А.О., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Зоров И.Н., Синицын А.П. // Прикл. биохим. и микробиол. 2012. Т. 48. № 1. С. 66.
92. Рубцова Е.А., Бушина Е.В., Рожкова А.М., Короткова О.Г., Немашкалов В.А., Кошелев А.В., Синицын А.П. // Прикл. биохим. и микробиол. 2015. Т. 51. № 5. С. 502.
93. Sinitsyn A.P., Rozhkova A.M. // Microorganisms in Biorefineries, Microbiology Monographs 26 (Kamm B. ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015. P. 2.
94. Синицына О.А., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Серебряный В.А., Вавилова Е.А., Винецкий Ю.П., Синицын А.П. // Биохимия. 2003. Т. 68. №. 12. С. 1631
95. Синицына О.А., Фёдорова Е.А., Вакар И.М., Кондратьева Е.Г., Рожкова А.М., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Чулкин А.М., Винецкий Ю.П., Синицын А.П. // Биохимия. 2008. Т. 73. Вып. 1. С. 127.
96. Sinitsyna O.A., Fedorova E.A., Semenova M.V., Gusakov A.V., Sokolova L.M., Bubnova T.M., Okunev O.N., Chulkin A.M., Vavilova E.A., Vinetsky Y.P., Sinitsyn A.P. // Biochemistry (Moscow). 2007. Vol. 72. N 5. P. 565.
97. Синицын А.П. // Мат-лы междунар. науч. конф. «Биотехнологии в химико-лесном комплексе». Архангельск, 2014. С. 276.
98. Gusakov A.V., Sinitsyna O.A., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. // Carbohydr. Res. 2013. Vol. 382. P. 71.
99. Фёдорова Т.В., Чулкин А.М., Вавилова Е.А., Майсурадзе Е.Г., Трофимов А.А., Зоров И.Н., Хотченков В.П., Поляков К.М., Беневоленский С.В., Королёва О.В., Ламзин В.С. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 10. С. 1433.
100. Бухтояров Ф.Е., Устинов Б.Б., Саланович Т.Н., Антонов А.И., Гусаков А.В. Окунев О.Н., Синицын А.П. // Биохимия. 2004. Т. 69. Вып. 5. С. 666.
101. Grishutin S.G., Gusakov A.V., Markov A.V., Ustinov B.B., Semenova M.V., Sinitsyn A.P. // Biochim. Biophys. Acta. 2004. Vol. 1674. P. 268.
102. Gusakov A.V., Salanovich T.N., Antonov A.I., Ustinov B.B., Okunev O.N., Burlingame R., Emalfarb M., Baez M., Sinitsyn A.P. // Biotechnol. Bioeng. 2007. Vol. 97. N 5. P. 1028.
103. Ustinov B.B., Gusakov A.V., Antonov A.I., Sinitsyn A.P. // Enzyme Microb. Technol. 2008. Vol. 43. P. 56.
104. Baez-Vasquez M.A., Sinitsyn A.P. // in: Wall J.D., Harwood C.S., Demain A. (eds.). Bioenergy. ASM Press, Washington DC, 2008. P. 139.
105. Доценко Г.С., Семёнова М.В., Синицына О.А., Хинц С.В.А., Вери Я., Зоров И.Н., Кондратьева Е.Г., Синицын А.П. // Биохимия. 2012. Т. 77. Вып. 11. С. 1556.
106. Dotsenko G.S., Sinitsyna O.A., Hinz S.W.A., Wery J., Sinitsyn A.P. // Bioresour. Technol. 2012. Vol. 112. P. 345.
107. Visser H., Joosten V., Punt P.P., Gusakov A.V., Olson P.T., Joosten R., Bartels J., Visser J., Sinitsyn A.P., Emalfarb M.A., Verdoes J.C., Wery J. // Ind. Biotechnol. 2011. Vol. 7. N 3. P. 214.
108. Кастельянос О., Синицын А.П., Власенко Е.Ю. // Прикл. биохим. и микробиол. 1994. Т. 30. № 6. С. 799.
109. Скомаровский А.А., Марков А.В., Гусаков А.В., Кондратьева Е.Г., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Матыс В.Ю., Синицын А.П. // Прикл. биохим. и микробиол. 2006. Т. 42. № 6. С. 674.
110. Berlin A., Gilkes N., Kilburn D., Maximenko V., Bura R., Markov A., Skomarovsky A., Gusakov A., Sinitsyn A., Okunev O., Solovieva I., Saddler J.N. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2006. Vol. 129–132. P. 528.
111. Berlin A., Gilkes N., Kilburn D., Bura R., Markov A., Skomarovsky A., Okunev O., Gusakov A., Maximenko V., Gregg D., Sinitsyn A., Saddler J. // Enzyme Microb. Technol. 2005. Vol. 37. P. 175.
112. Kurabi A., Berlin A., Gilkes N., Kilburn D., Bura R., Robinson J., Markov A., Skomarovsky A., Gusakov A., Okunev O., Sinitsyn A., Gregg D., Xie D., Saddler J.N. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2005. Vol. 121–124. P. 219.
113. Gut'erres B., Sinitsyn A.P., Kastel'yanos O.F., Berlin A.Kh., Kovalev G.V., Okunev O.N. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1998. Vol. 34. N 6. P. 564.
114. Gusakov A.V. // Trends Biotechnol. 2011. Vol. 29. N 9. P. 419.
115. Чекушина А.В., Доценко Г.С., Кондратьева Е.Г., Синицын А.П. // Биотехнология. 2013. № 3. С. 69.
116. Беккаревич А.О., Немашкалов В.А., Кошелев А.В., Горячев Д.А., Бубнова Т.В., Матыс В.Ю., Осипов Д.О., Кондратьева Е.Г., Окунев О.Н., Синицын А.П. // Прикл. биохим. и микробиол. 2015. Т. 51. № 2. С. 229
117. Kostyleva E.V., Sereda A.S., Osipov D.O., Velikoretskaya I.A., Tsurikova N.V. // Microbiol. Insights. 2019. Vol. 12. P. 1.
118. Костылева Е.В., Цурикова Н.В., Середа А.С., Великорецкая И.А., Веселкина Т.Н., Лобанов Н.С., Шашков И.А., Синицын А.П. // Микробиология. 2018. Т. 87. № 5. С. 530.
119. Костылева Е.В., Середа А.С., Великорецкая И.А., Айсина А.М., Цурикова Н.В., Рубцова ЕА., Сатрутдинов А.Д., Синицын А.П. // Прикл. биохим. и микробиол. 2021. Т. 57. № 1. С. 1.
120. Castellanos O., Sinitsyn A.P., Ermolova O.V., Popova N.N., Guttierez B., Antonova V.A., Berlin A., Kerns G. // Biochemistry (Moscow). 1995. Vol. 60. N 10. P. 1231.
121. Синицына О.А., Фёдорова Е.А., Правильников А.Г., Рожкова А.М., Скомаровский А.А., Матыс В.Ю., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Винецкий Ю.П., Синицын А.П. // Биохимия. 2010. Т. 75. Вып. 1. С. 52
122. Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravilnikov A.G., Osipov D.O., Sinitsyn A.P. // Biotechnol. J. 2010. Vol. 5. P. 871.
123. Короткова О.Г., Семёнова М.В., Морозова В.В., Зоров И.Н., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Синицын А.П. // Биохимия. 2009. Т. 74. Вып. 5. С. 699.
124. Гусаков А.В, Синицын А.П. / Химия биомассы:

биотоплива и биопластики. Ред. С.Д. Варфоломеев. М., 2017. С. 65.
125. Соловьёва И.В., Окунев О.Н., Вельков В.В., Кошелев А.В., Бубнова Т.В., Кондратьева Е.Г., Скомаровский А.А., Синицын А.П. // Микробиология. 2005. Т. 74. № 2. С. 1.
126. Кислицын В.Ю., Чулкин А.М., Зоров И.Н., Шашков И.А., Сатрутдинов А.Д., Синицын А.П., Рожкова А.М. // Биотехнология. 2021. Т. 37. № 1. С. 45.
127. Сатрутдинов А.Д., Шашков И.А., Кондратьева Е.Г., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Синицын А.П. // Науч. тр.СКНЦСВВ. 2018, Т. 21. С. 164.
128. Синицын А.П., Рожкова А.М., Синицына О.А., Фёдорова Е.А., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Соколова Л.М., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Винецкий Ю.П., Черноглазов В.М., Зоров И.Н. // Пат. РФ 2378372. Бюл. 16.01.10.2010.
129. Синицын А.П., Синицына О.А., Зоров И.Н., Рожкова А.М. // Прикл. биохим. и микробиол. 2020. Т. 56. № 6. С. 551.
130. Синицын А.П., Синицына О.А., Рожкова А.М. // Биотехнология. 2020. Т. 36. № 6. С. 24
131. Бушина Е.В., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Сатрутдинов А.Д., Беккаревич А.О., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Синицын А.П. // Прикл. биохим. и микробиол. 2012. Т. 48. № 5. С. 543.
132. Новожилов Е.В., Аксёнов А.С., Демидов М.Л., Чухчин Д.Г., Доценко Г.С., Осипов Д.О., Синицын А.П. // Биокатализ. 2014. № 4. С. 74.
133. Синицын А.П., Осипов Д.О., Рожкова А.М., Бушина Е.В., Доценко Г.С., Синицына О.А., Кондратьева Е.Г., Зоров И.Н., Окунев О.Н., Немашкалов В.А., Матыс В.Ю., Кошелев А.В. // Биотехнология. 2013. № 5. С. 40.
134. Синицын А.П., Короткова О.Г., Синицына О.А., Рожкова А.М., Доценко Г.С., Проскурина О.В., Осипов Д.О., Кондратьева Е.Г., Чекушина А.В. // Катализ в промышленности. 2015. Т. 15. № 6. С. 78.
135. Проскурина О.В., Короткова О.Г., Рожкова А.М., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Немашкалов В.А., Синицына О.А., Синицын А.П. // Катализ в промышленности. 2013. № 5. С. 65.
136. Синицын А.П., Волков П.В., Рубцова Е.А., Шашков И.А., Рожкова А.М., Синицына О.А., Кондратьева Е.Г., Зоров И.Н., Сатрутдинов А.Д., Мерзлов Д.А., Матыс В.Ю. // Катализ в промышленности. 2017. Т. 17. № 5. С. 407.
137. Bulakhov A.G., Volkov P.V., Rozhkova A.M., Gusakov A.V., Nemashkalov V.A., Satrutdinov A.D., Sinitsyn A.P. // PLOS One. 2017. 0170404.
138. Семёнова М.В., Гусаков А.В., Телицын В.Д., Матыс В.Ю., Бубнова Т.В., Немашкалов В.А., Рожкова А.М., Синицын А.П. // Прикл. биохим. и микробиол. 2022. Т. 58. № 4. С. 366.
139. Чекушина А.В., Доценко Г.С., Кондратьева Е.Г., Синицын А.П. // Биотехнология. 2013. № 3. С. 58.
140. Семёнова М.В., Рожкова А.М., Осипова Д.О., Сатрутдинов А.Д., Синицына О.А., Рубцова Е.А., Кондратьева Е.Г., Синицын А.П. // Прикл. биохим. и микробиол. 2019. Т. 55. № 6. С. 586.
141. Karp S.G., Rozhkova A.M., Semenova M.V., Osipov D.O., de Pauli S.T.Z., Sinitsyna O.A., Zorov I.N., Vandenberghe L.P. de S., Soccol C.R., Sinitsyn A.P. // Bioresour. Technol. 2021. Vol. 330. 124888.
142. Проскурина О.В., Короткова О.Г., Рожкова А.М., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Немашкалов В.А., Синицына О.А., Ревин В.В., Синицын А.П. // Катализ в промышленности. 2013. № 6. С. 73.
143. Semenova M.V., Gusakov A.V., Volkov P.V., Matys V.Yu., Nemashkalov V.A., Telitsin V.D., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. // Mol. Biol. Rep. 2019. Vol. 46. P. 2363.
144. Булахов А.Г., Гусаков А.В., Чекушина А.В., Сатрутдинов А.Д., Кошелев А.В., Матыс В.Ю., Синицын А.П. // Биохимия. 2016. Т. 81. Вып. 5. С. 701.
145. Проскурина 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., Синицын А.П. // Прикл. биохим. и микробиол. 2015. Т. 51. № 6. С. 592.
146. Булахов А.Г., Гусаков А.В., Рожкова А.М., Волков П.В., Матыс В.Ю., Зоров И.Н., Синицын А.П. // Катализ в промышленности. 2017. Т. 17. № 6. С. 554.
147. Семёнова М.В., Гусаков А.В., Телицын В.Д., Синицын А.П. // Прикл. биохимия и микробиол. 2021. Т. 57. № 5. С. 477.
148. Semenova M.V., Gusakov A.V., Telitsin V.D., Rozhkova A.M., Kondratieva E.G., Sinitsyn A.P. // Protein and Proteomics 1868. 2020. P. 140297.
149. Gusakov A.V., Bulakhov A.G., Demin I.N., Sinitsyn A.P. // Carbohydr. Res. 2017. Vol. 452. P. 156.
150. Телицын В.Д., Семёнова М.В., Осипов Д.О., Гусаков А.В., Синицын А.П. // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. 2020. Т. 61. № 2. С. 37.
151. Martin C., Volkov P.V., Rozhkova A.M., Puls J., Sinitsyn A.P. // Ind. Crop. Prod. 2015. Vol. 77. P. 382.
152. 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. Vol. 10. 1348.
153. Синицын А.П., Синицына О.А. // Успехи биол. химии. 2021. Т. 61. С. 347.
154. Берлин А.Х., Тихомиров Д.Ф., Гутьеррес Б.Р., Гусаков А.В., Попова Н.Н., Синицын А.П. // Прикл. биохим. и микробиол. 1998. Т. 34. № 4. С. 382.
155. Гусаков А.В., Попова Н.Н., Берлин А.Х., Синицын А.П. // Прикл. биохим. и микробиол. 1999. Т. 35. № 2. С. 137.
156. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Berlin A.G., Popova N.N., Markov A.V., Okunev O.N., Tikhomirov D.F., Emalfarb M. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1998. Vol. 75. P. 279.
157. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Berlin A.G., Markov A.V., Ankudimova N.V. // Enzyme Microb. Technol. 2000. Vol. 27. P. 78.
158. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Berlin A.G., Markov A.V., Skomarovsky A.A., Sinitsyna O.A., Berlin A.G., Ankudimova N.V. // Вестн. Моск. ун-та. 2000. Спец. вып. P. 664.
159. Синицын А.П., Рожкова А.М., Синицына О.А., Холмова М.А., Терентьев К.Ю., Казаков Я.В., Чухчин Д.Г., Новожилов Е.В. // Катализ в промышленности. 2015. Т. 15. № 6. С. 84.

160. Холмова М.А., Терентьев К.Ю., Казаков Я.В., Новожилов Е.В., Синицына О.А., Рожкова А.М., Синицын А.П., Ивлева А.Р. // Вестн. Казан. технол. ун-та. 2015. Т. 18. № 5. С. 101.
161. Klyosov A.A., Dotsenko G.S., Hinz S.W.A., Sinitsyn A.P. // Carbohydr. Res. 2012. Vol. 352. P. 65.
162. Феофилова Е.П. // Микробиология. 2010. Т. 79. № 6. С. 723.
163. Синицына О. А., Рубцова Е.А., Синельников И.Г., Осипов Д.О., Рожкова А.М., Матыс В.Ю., Бубнова Т.В., Немашкалов В.А., Середа А.С., Щербакова Л.А., Синицын А.П. // Биохимия. 2020. Т. 85. Вып. 6. С. 840.
164. Середа А.С., Великорецкая И.А., Осипов Д.О., Матыс В.Ю., Бубнова Т.В., Немашкалов В.А., Синицына О.А., Рожкова А.М., Цурикова Н.В., Синицын А.П. // Изв. Уфимского научного центра РАН. 2018. № 3 (2). С. 31.
165. Volkov P.V., Rubtsova E.A., Rozhkova A.M., Sinitsyna O.A., Zorov I.N., Kondratyeva E.G., Sinitsyn A.P. // Carbohydr. Res. 2021. Vol. 499. P. 108211.
166. Volkov P.V., Gusakov A.V., Rubtsova E.A., Rozhkova A.M., Matys V. Yu., Nemashkalov V.A., Sinitsyn A.P. // Biochimie. 2019. № 157. P. 123.
167. Романова Ю.М., Тутельян А.В., Синицын А.П., Писарев В.М., Алексеева Н.В., Филипова Н.И., Толордава Э.Р., Синицына О.А., Емшанов О.В. // Медицинский алфавит. 2019. Т. 4. № 34. С. 40.
168. Тутельян А.В., Романова Ю.М., Маневич Б.В., Юшина Ю.К., Фёдорова Л.С., Синицына О.А., Синицын А.П., Емшанов О.В. // Молочная промышленность. 2020. № 10. С. 4.
169. Цурикова Н.В., Нефёдова Л.И., Костылева Е.В., Звенигородский В.И., Ясиновский В.Г., Воейкова Т.А., Синицын А.П. // Прикл. биохим. и микробиол. 2002. Т. 38. № 5. С. 502.
170. Синицын А.П., Окунев О.Н., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Цурикова Н.В., Бурцева Э.И., Весёлкина Т.Н., Черноглазов В.Н., Кондратьева Е.Г., Румянцев С.Д., Морозов А.М., Алексеев А.П., Шмытова М.В. // Производство спирта и ликёроводочных изделий. 2001. № 3. С. 16.
171. Костылева Е.В., Середа А.С., Великорецкая И.А., Бурцева Э.И., Весёлкина Т.Н., Нефёдова Л.И., Шариков А.Ю., Цурикова Н.В., Лобанов Н.С., Синицын А.П. // Микробиология. 2017. Т. 86. № 4. С. 483.
172. Зоров И.Н., Семёнова М.В., Цурикова Н.В., Синицын А.П. // Прикл. биохим. и микробиол. 2006. Т. 42. № 6. С. 700.
173. Середа А.С., Нефёдова Л.И., Весёлкина Т.Н., Бурцева Э.И., Костылева Е.В., Цурикова Н.В., Синицын А.П., Окунев О.Н., Барышникова Л.М. / Микробные биокатализаторы и их роль в нано- и биотехнологиях. Сб. научных трудов. Ред. В.А. Поляков, Л.В. Римарева. М., 2008. С. 20.
174. Семёнова М.В., Гришутин С.Г., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Синицын А.П. // Биохимия. 2003. Т. 68. Вып. 5. С. 686.
175. Рожкова А.М., Середа А.С., Цурикова Н.В., Нуртаева А.К., Семёнова М.В., Римарева Л.В., Рубцова Е.А., Зоров И.Н., Синицына О.А., Синицын А.П. // Прикл. биохим. и микробиол. 2011. Т. 47. № 3. С. 308.
176. Винецкий Ю.П., Рожкова А.М., Середа А.С., Цурикова Н.В., Нуртаева А.К., Семёнова М.В., Зоров И.Н., Синицын А.П. // Прикл. биохим. и микробиол. 2010. Т. 46. № 6. С. 685.
177. Семёнова М.В., Синицына О.А., Морозова В.В., Фёдорова Е.А., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Соколова Л.М., Кошелев А.В., Бубнова Т.В., Винецкий Ю.П., Синицын А.П. // Прикл. биохим. и микробиол. 2006. Т. 42. № 6. С. 681.
178. Волчок А.А., Бушина Е.В., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Щербаков С.С., Синицын А.П. // Биотехнология. 2013. № 5. С. 78.
179. Волчок А.А., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Синицын А.П., Щербаков С.С. // Виноделие и виноградарство. 2014. № 1. С. 36.
180. Волчок А.А., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Щербаков С.С., Синицын А.П. // Изв. ТСХА. 2015. № 5. С. 123.
181. Синицын А.П., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Синицына О.А., Волков П.В., Ефременко Е.Н., Матыс В.Ю., Немашкалов В.А. // Пат. РФ 2646136. Бюл. 16. 01.03.2018.
182. Синицына О.А., Рубцова Е.А., Осипов Д.О., Кондратьева Е.Г., Семёнова М.В., Королёв А.И., Ярошенко Е.В., Рожкова А.М., Немашкалов В.А., Синицын А.П. // Биотехнология. 2022. Т. 38. № 2. С. 14.
183. Волков П.В., Синицына О.А., Фёдорова Е.А., Рожкова А.М., Сатрутдинов А.Д., Зоров И.Н., Окунев О.Н., Гусаков А.В., Синицын А.П. // Биохимия. 2012. Т. 77. Вып. 5. С. 611.
184. Лазарев А.П., Синицын А.П., Левашов А.В., Черноглазов В.М., Гусаков А.В., Варфоломеев С.Д., Кучерявенко А.А., Клячко Н.Л., Калюжный С.В. // Пат. SU 1674773. Бюл. 33. 07.09.1991
185. Лазарев А.П., Синицын А.П., Черноглазов В.М., Левашов А.В., Гусаков А.В., Варфоломеев С.Д., Клячко Н.Л., Калюжный С.В., Кучерявенко А.А. // Пат. SU 1674774. Бюл. 33. 07.09.1991.
186. Синицын А.П., Лазарев А.П., Левашов А.В., Черноглазов В.М., Варфоломеев С.Д., Гусаков А.В., Калюжный С.В. // Пат. SU 1674775. Бюл. 33. 07.09.1991.
187. Зоров И.Н., Синицын А.П., Кондратьева Е.Г. // Прикл. биохим. и микробиол. 2006. Т. 42. № 6. С. 705.
188. Синицын А., Синицына О., Короткова О., Мосеев П., Кержнер М. // Агробизнес. 2016. № 4. С. 88.
189. Короткова О.Г., Синицына О.А., Кондратьева Е.Г., Кержнер М.А., Мосеев П.А., Синицын А.П. // Птицеводство. 2016. № 5. С. 8.
190. Синицын А.П., Короткова О.Г., Рубцова Е.А., Синицына О.А., Кондратьева Е.Г., Середа А.С., Зоров И.Н., Рожкова А.М. // Биотехнология. 2019. Т. 35. № 4. С. 6.
191. Денисенко Ю.А., Мерзлов Д.А., Гусаков А.В., Чекушина А.В., Синицын А.П. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2015. Т. 56. № 6. С. 348.
192. Синицын А.П., Шашков И.А., Рубцова Е.А., Короткова О.Г., Синицына О.А. // Птицеводство. 2018. № 11–12. С. 34.

193. Синицын А.П., Рубцова Е.А., Шашков И.А., Рожкова А.М., Синицына О.А., Кондратьева Е.Г., Зоров И.Н., Мерзлов Д.А., Осипов Д.О., Матыс В.Ю. // Катализ в промышленности. 2017. Т. 17. № 4. С. 331.
194. Рожкова А.М., Мерзлов Д.А., Баширова А.В., Зоров И.Н., Короткова О.Г., Шашков И.А., Синицын А.П. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2018. Т. 59. № 2.
195. Синицын А.П., Зоров И.Н., Синицына О.А., Рожкова А.М., Мерзлов Д.А., Матыс В.Ю., Шашков И.А., Сатрутдинов А.Д. // Пат. РФ 2653429. Бюл. 13. 08.05.2018.
196. Короткова О.Г., Рубцова Е.А., Шашков И.А., Волчок А.А., Кондратьева Е.Г., Синицына О.А., Рожкова А.М., Сатрутдинов А.Д., Денисенко Ю.А., Семёнова М.В., Синицын А.П. // Катализ в промышленности. 2018. Т. 18. № 4. С. 72.
197. Егоров И.А., Егорова Т.В., Мосеев П.А., Кержнер М.А., Синицын А.П. // Птицеводство. 2018. № 1. С. 16.
198. Ниязов Н.С.-А., Кержнер М.А., Мосеев П.А., Зоров И.Н., Рожкова А.М., Синицын А.П. // Свиноводство. 2018. 5. С. 25.
199. Синицын А.П., Бетин А.Н., Цурикова Н.В., Костылева Е.В., Середа А.С., Великорецкая И.А., Весёлкина Т.Н., Кержнер М.А. // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2017. № 7. С. 58.
200. Ниязов Н., Синицын А., Зоров И., Рожкова А., Кержнер М., Мосеев П. // Комбикорма. 2019. № 4. С. 64.

**Информация об авторах**

Синицын Аркадий Пантелеймонович – зав. лаборатории физико-химии ферментативной трансформации полимеров, химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (apsinitsyn@gmail.com);

Синицына Ольга Аркадьевна – ст. науч. сотр. лаборатории физико-химии ферментативной трансформации полимеров, химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (oasinitsyna@gmail.com);

Зоров Иван Никитич – ст. науч. сотр. лаборатории физико-химии ферментативной трансформации полимеров, химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (inzorov@mail.ru);

Рожкова Александра Михайловна – ст. науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ст. науч. сотр. лаборатории физико-химии ферментативной трансформации полимеров химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (amrojkova@yahoo.com).

**Вклад авторов**

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 15.02.2023;
одобрена после рецензирования 21.02.2023;
принята к публикации 14. 03.2023.