

ТЕХНОЛОГІЯ ПРОДУКТІВ БРОДІННЯ, БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА ФАРМАЦІЯ

УДК 577.152

Т.С. Глускіна З.Г. Піх*

Кооператив із виготовлення нестандартного
обладнання харчової промисловості “Вузлівчанка”,
*Національний університет "Львівська політехніка",
кафедра технології органічних продуктів

ПОШУК ПРОДУЦЕНТІВ ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ

© Глускіна Т.С., Піх З.Г., 2002

Систематизовані дані вітчизняних дослідників і технологів, а також їх колег країн СРСР про тенденції пошуку продуцентів лігноцелюлозолітичних ферментів, опубліковані за останні 15 років.

The data of the domestic researchers and technologists, and also their colleagues of the countries former USSR about the tendencies of search of producer's lignocellulosolytic of enzymes published for last 15 years are systematized.

Сьогодні вивчено наявність багатоконпонентних лігноцелюлозолітичних ферментних комплексів у продуцентів різних таксономічних груп. Але навіть наявність продуцентів целюлаз з надзвичайно високими продуктивністю біосинтезу ферментів і концентрацією позаклітинного білка не є гарантією їх ефективного промислового впровадження [1, 2, 3]. Біоконверсія рослинних субстратів характеризується глибокими відмінностями, які зумовлені фізико-хімічною та анатомічною будовою самого субстрату, особливостями штаму, виду і місця його заселення, а також індивідуальністю самих ферментних комплексів деструкторів [4, 5, 6, 7, 8]. Тому при реалізації процесу ферментативного гідролізу целюлозомісних матеріалів у промислових масштабах однією з найважливіших задач поряд з пошуком найбільш перспективних джерел рослинної сировини і методів її попередньої обробки та оптимізацією умов ферментативного гідролізу з урахуванням необхідного апаратного оформлення є одержання активних, збалансованих за компонентним складом лігноцелюлазних препаратів. Незважаючи на певні досягнення у цій галуззі, ферментативне одержання вуглеводів з відновлюваної рослинної сировини і досі залишається одним з важливих напрямків сучасної біотехнології.

Одержання конкретних даних про фізико-хімічні та каталітичні властивості виявлених активних продуцентів багатоконпонентних целюлаз, геміцелюлаз і лігніназ відкриває нові можливості для узагальнення сучасних відомостей про пошук продуцентів лігноцелюлолітичних ферментів. Кількість публікацій за цією проблемою, яка значно збільшилася за останній час, робить необхідним висвітлення цього питання. У зв'язку з наявністю досить великої бібліографії у даному огляді намагались цитувати джерела, які були опубліковані лише за останні 15 років. Детальний опис штамів та методичних прийомів наведений у публікаціях, які цитуються нижче.

В кінці 80-х рр. була сформована схема скринінгу, яка містила відбір продуцентів не за валовою активністю, а за технологічними якостями ферментів, які вони утворюють: питомою активністю, стабільністю, здатністю адсорбуватись на поверхні субстрату

(целюлози), субстратною специфічністю, ступенем інгібування продуктами гідролізу (глюкозою, целобіозою...) та іншими [1, 3, 9].

Так, досліджували целюлазні комплекси різного походження (бактерій, мікроміцетів, морських безхребетних – всього з 30 джерел) [3]. Було показано, що ендоглюканазна активність у більшому ступені продукується грибами роду *Trichoderma*, а целобіазна – грибами роду *Aspergillus*. Найбільш термостабільними є препарати целюлаз термофільних бактерій *Clostridium thermocellum* і термофільних грибів *Aspergillus versicolor*. Найбільш ефективно адсорбуються на целюлозі ферментні препарати *Tr. reesei* і *Cl. thermocellum*. Найменш чутливі до інгібування продуктами гідролізу целюлози є ферментні препарати, одержані з грибів *Actinomyces diastatias* і *Asp. fumigatus* [3]. За результатами скринінгу було виділено два продуценти *Cl. thermocellum* і *Asp. versicolor*, які найбільш повно на той час відповідали переліченим вище критеріям.

Ґрунти є одним з найбільш зручних джерел для виділення мікроорганізмів, які беруть участь у розщепленні целюлози. Відмічено, що розповсюдження целюлорозкладаючих грибів у різних типах ґрунтів є неоднакове [10, 11]. Під час вивчення мікроміцетів та актиноміцетів, виділених з ґрунтів, рослинних субстратів і гарячих джерел різних ґрунтово-кліматичних областей Грузії, на здатність біосинтезу целюлаз відібраний термофільний штам *Allescheria terrestris*. УФ-опроміненням його конідій одержали мутантний штам *All. terrestris H-1*, який характеризується підвищеною здатністю біосинтезу целюлаз з високою термостабільністю, не токсичний і не патогенний. Час напівінактивації при 70°C і рН 4,6 активності за Na-карбоксиметилцелюлозою (Na-КМЦ) – 96 хв, а активності за фільтрувальним папером (ФП) – всього 6 хв [10]. Встановлено, що актиноміцет *Actinomyces flavascens GB1* здатний трансформувати і хімічномодифікований лігнін [12]. Мікроміцет *Trichoderma longibrachiatum* розглядається вченими [13] як один з найцікавіших з погляду каталітичних властивостей компонентів целюлазного комплексу.

Вивчалась активність деяких гідролітичних та окисно-відновних ферментів штамів *Fusarium oxysporum* – одного з найбільш шкідливих видів мікроміцетів [14]. Штами, виділені з уражених зернових культур, активніше продукували целюлазу, ендо-1,4- β -ксиланазу та β -глюкозидазу. За ступенем активності цих ферментів досліджені штами розподілялись у такій послідовності: штами з рослин (Р) > штами з окультурених ґрунтів різних регіонів України (ОГ) > штами з неокультурених ґрунтів різних регіонів України (НГ). За проявом активності монофенол-монооксигенази та пероксидази більш активні були ґрунтові штами: НГ > ОГ > Р [14].

Визначили целюлазну активність (ЦА) і прослідкували зміну видів мікроміцетів у зразках торфу з верхового болота при різних температурах, внесенні мінеральних елементів, а також вологості [15, 16, 17]. Найбільш низька ЦА, але найбільше різноманіття мікроміцетів виявлені при відсутності мінеральних добавок при 25°C. Підвищення температури до 38°C і внесення мінеральних солей призводило до зростання ЦА та до зниження і зміни різноманіття виявлених мікроміцетів. Так, ЦА чистої культури *Aspergillus fumigatus* при вирощуванні на середовищі Чапека – Докса з ФП дорівнює 2,8 та 0,9 мкг редуруючих цукрів/(мл·год) при 38°C і 25°C, відповідно [15].

У природних біоценозах целюлоза, геміцелюлоза та лігнін розкладаються деполімеразами багатьох мікроорганізмів-симбіотиків, тому найбільш перспективним, на думку деяких авторів [18, 19], є пошук та селекція мікроміцетів, які швидко ростуть, накопичують багато біомаси та продукують повні, збалансовані за лігнолітичним та целюлолітичним активностям ферментні комплекси. Позаклітинний комплекс целюлаз частіше зустрічається та характеризується більш широким спектром і більш високими

активностями ферментів серед грибів роду *Aspergillus* [10, 19]. Тому найбільш перспективним, на погляд деяких авторів [11, 19], є пошук штамів серед грибів роду *Asp.* Так, при проведенні прямої біоконверсії кукурудзяної кочережки грибом *Asp. sp.* ВКПМФ-559 вихід білка за 18 год культивування становив 17,2 % із ступенем утилізації целюлози 80% [19]. Відібрані культура *Asp. fumigatus* 46, залишкова активність якої за ендоглюканазою зберігалась на рівні 30% від вихідної понад 70 год, та *Asp. fisheri* 39, залишкова активність якої за ФП зберігалась на рівні 30 % від вихідної понад 60 год [11].

Вивчалась здатність мікроорганізмів різноманітних таксономічних груп до гідратації гідролізного лігніну (ГЛ) з метою одержання продуктів, придатних для використання у сільському господарстві (добрив, засобів захисту рослин та препаратів, збагачених білком) [7, 20]. З досліджених мікроміцетів за здатністю активно утилізувати целюлозу та лігнін Класона і у 4 – 6 разів збагачувати субстрат білком виділені гриби роду *Penicillium*: *P. fellutanum* F-1292, *P. verruculosum* 49 БИМ і *P. vinaceum* F-1030. Характерною особливістю представників роду *Aspergillus* є переважне використання лігніну Класона (у лігнобіомасі накопичує до 7 % білка). Практичне використання цих культур як деструкторів ГЛ доцільно у асоціації з целюлолітичними штамми для більш повного засвоєння целюлози субстрату. *Bacillus polymyxa* B-586 і *Arthrobacter variabilis* B-671 за 3 доби розкладали до 23 % целюлози і 16 % лігніну Класона. Особливий інтерес як деструктори ГЛ становлять дріжджі *Trichosporon sp.* – нетоксичні, з високим ступенем утилізації целюлози та лігніну Класона, з високою швидкістю росту, стійкі до контамінації сторонньою мікрофлорою, що забезпечує ведення процесу у напівстерильних умовах [20]. Виявлена біостимулююча дія післядріжджової бражки (рідкого відходу гідролізно-дріжджового виробництва) на деструкцію ГЛ дріжджеподібним грибом *Trichosporan cutaneum* [21]. При концентрації азоту 16 мМ він збагачував субстрат білком на 12 % при ступені деградації лігніну Класона 23 %. Завдяки високій швидкості росту і високій загальній лігнолітичній активності у порівнянні з макроміцетами досліджений штам дозволяє значно інтенсифікувати лігноліз. Тому дану нешкідливу культуру можна рекомендувати як продуцент біомаси для кормових цілей. Культури *Paecilomyces sp.* і *Cladosporium sp.* можуть бути рекомендовані для біологічного захисту рослин [20].

Базидіальні гриби мають високу проникну здатність міцелію у нерозчинний рослинний субстрат завдяки секреції широкого спектра позаклітинних ферментів з потужними гідролітичною та окислювальною активностями і здійснюють деструкцію всіх біополімерів (у тому числі лігноцелюлози) рослинних залишків та деревини [5, 19, 22, 23, 24]. А тому їх також розглядають як перспективні продуценти багатоконпонентних целюлаз, геміцелюлаз і лігніназ. Багато робіт [4, 5, 6, 7, 8, 22, 23, 24] вивчають целюлолітичні ферменти базидіальних грибів. Основний розклад лігноцелюлозних субстратів у природі відбувається за участю грибів білої гнилі [5, 24]. У результаті скринінгу дереворуйнуючих грибів відібрані активні культури базидіоміцетів, такі, як *Pleurotus ostreatus*, *Panus tigrinus*, *Fomes fomentarius* і *Inonotus hispidus* [4, 6]. Усі вони активно утилізували лігнін костри кенафу як єдине джерело вуглецю в середовищі. Під час росту та розвитку цих грибів упродовж 30 діб відбувається утилізація целюлози на 23 – 78 %, геміцелюлози – на 21 – 80,4 %, лігніну – на 21 – 58 %. Найбільша деградація біополімерів відбувається протягом 10 діб культивування цих грибів [6]. Гриби *P. tigrinus* та *P. ostreatus* поряд з проявленням целобіазної, ендоглюканазної та ксиланазної активностей секретують ферменти пероксидазу і лаказу, на відміну від грибів *F. fomentarius*

і *I. hispidus*, які не секретують лаказу [4, 5, 6]. Тобто вони є універсальними культурами, що мають весь набір ферментів, які беруть активну участь у розкладі лігноцелюлозних рослинних відходів. А гриб *I. hispidus* є перспективним для використання як продуцент целюлази, а також для одержання грибної біомаси та білка [4]. Проведений відбір їстівних базидіальних грибів (продуцентів лігноцелюлолітичних ферментів і мікробного білка) при їх глибинному культивуванні у присутності цитрусового жому [23]. Найбільшою лаказною активністю відрізнялись *Panus tigrinus* 0789, *Pleurotus ostreatus* ІБР-13 та *Lentinus tigrinus* ІБР-101, а КМЦазною та ксиланазною – *Lentinus edodes* 0779. За допомогою вищих базидіоміцетів, які викликають так звану білу гниль деревини, утилізували ГЛ у вигляді компонента ростового субстрату з метою одержання кормового препарату [7]. При використанні гриба *Panus tigrinus* 8/18 в суміші ГЛ, пшеничної або житньої соломи або молочної сироватки зменшення лігніну становило 33 %, а приріст “істинного” білка був втричі вищий, ніж на солі без ГЛ. При цьому виявлений біосинтез Mn-пероксидази та оксидази.

Найбільш продуктивні мутантні штами мікроміцетів, які використовуються нині, одержані з менш продуктивних диких форм саме генетичними методами [25]. Методи клітинної інженерії, зокрема цілеспрямоване злиття протопластів, відкривають широкі перспективи для одержання рекомбінантних мікроорганізмів на основі лігнолітичних та целюлолітичних грибів [26, 27]. Для правильного підбору партнерів злиття необхідно провести ретельний скринінг мікроорганізмів за їх біохімічними характеристиками. Регенерацією протопластів *Trichoderma harzianum* 19 була одержана протопласна культура *T. harzianum* T-1, яка має більш високу активність целюлолітичних ферментів і синтезом білка порівняно з вихідною культурою [28]. Розроблені способи одержання протопластів з базидіоміцетів білої гнилі *Pleurotus salignus* та *Panus tigrinus* [27], а також базидіоміцетів – *Phanerochaete chrysosporium* і *Pleurotus ostreatus* (продуценти лігнінази) та дейтеромицетів – *Tr. reesei* і *T. Longibrachiatum* (продуценти целюлази), з використанням літичної суміші ферментних препаратів з *Tr. reesei* і *Asp. foetidus* [26]. Протопласти, що утворилися, є життєздатними упродовж 7 – 8 діб при 4°C і 24 год при кімнатній температурі [26].

У передшлунках жуйних і у травному тракті багатьох трав'янистих моногастричних тварин живуть анаероби грибів. Ризоїди цих грибів глибоко проникають у субстрат, що у поєднанні з широким спектром полісахаразних та глікозидазних активностей дає змогу цим мікроорганізмам розщеплювати лігнофіковані рослинні тканини, які важко гідролізуються. На думку деяких авторів, целюлази аеробних грибів, які на 80 – 90 % секретуються у довкілля і мають активність відносно кристалічної целюлози, можуть мати незвичайні властивості [29]. З цього погляду гриби рубця крупної рогатої худоби становлять інтерес як можливі продуценти целюлази або донорів целюлазних генів. Серед цих мікроорганізмів-целюлолітиків були виділені бактерії: *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens*, *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrinosolvans* та ін., а також гриби – анаеробні хітрідіоміцети, які належать до сімейства *Neocallimasticaceae* [9, 30]. Сформульовано припущення про існування конкурентних відносин між целюлолітичними мікроорганізмами рубця, які призводять до неповного переварювання клітковини [30]. З рубця крупної рогатої худоби були виділені два штами *Neocallimastix* sp. 71 і *Piromonas* sp. 12, які проявляють КМЦазну, целобіазну, амілазну і ксиланазну активності [29]. Головними продуктами зброджування пшеничної соломи, ФП та целобіози у рідкому напівсинтетичному середовищі штамом 71 були ацетат, форміат, етанол і лактат, а штамом 12 – ацетат, форміат, лактат і сліди етанолу.

В останні десятиріччя особлива увага приділяється до пошуку термостабільних ферментів мікробного походження, багато з яких вже знайшли практичне застосування [11]. Використання термостабільних ферментів має ряд важливих переваг, у зв'язку з тим, що різко знижується контамінація ферментів сторонніми мікроорганізмами, зростає швидкість хімічних процесів і дифузія, може бути досягнута більш висока концентрація важко розчинних сполук у середовищі: їх термостабільні ферменти стійкі до органічних розчинників і денатурації [3, 10, 11, 25]. Зокрема використання таких термостабільних целюлаз, активних відносно високовпорядкованої кристалічної целюлози, дозволило б проводити гідроліз целюлозомісної сировини при температурі пастеризації [2, 18, 25, 31].

Термофільні анаеробні бактерії мають більш високу швидкість росту, ніж гриби, ареал їх проживання значно ширший, їх ферменти більш термостабільні [2, 9, 18]. Одним з небагатьох винятків є термофільний мікроскопічний гриб *Myceliophthora thermophila*, ендоглюканазна активність якого при 65° упродовж 7 діб знижалась не більше ніж у двічі [32, 33]. Важливою перевагою бактерій є і проста будова їх структурних генів та відсутність у них інтронів [9].

У великій кількості робіт йдеться про вивчення найбільш активних штамів і целюлаз анаеробної термофільної бактерії *Clostridium thermocellum* [9, 18, 34, 35, 36, 37, 38, 39]. Ці бактерії мають повноцінний комплекс целюлаз і дають змогу проводити не тільки гідроліз целюлози, а і проводити збродження продуктів гідролізу до етанолу з утворенням побічних продуктів: ацетату, лактату, CO₂ і H₂ [37, 38].

До продуцентів найбільш термостабільних целюлаз з періодом напівінактивації у культуральній рідині при 65°C 108 і 144 год належать штами 5 ті Ф7, відповідно, виділені з ґрунтів південних районів СРСР [35]. Ендоглюканазна фракція штаму Ф7 відрізняється високою термостабільністю в діапазоні рН 5,3 – 6,3 і має період напівінактивації при 65°C дорівнює 12 діб; гідролізує КМЦ, ФП та мікрокристалічну целюлозу (МКЦ) [36].

Вивчались ендоглюканази бактерій *Cl. thermocellum*, штаму № 3, виділеного з термальних джерел Камчатки [37]. Виділені основна форма її ендо-1,4-β-глюканази, яка становить 85% відповідної активності фільтрата культуральної рідини та характеризується періодом напівінактивації 19 год. при 65°C і 11 хв. при 75°C, та мінорна форма, що становить 15% загальної активності і має високу термостабільність: період напівінактивації дорівнює 25 діб при 65°C, 16 год при 75°C і 11 хв при 85°C. Це значно перевищує ті ж величини для найбільш термостабільних грибних ендоглюканаз. Але в очищеному виді вони характеризуються низькою спорідненістю до поверхні целюлози і не здатні при відсутності інших компонентів целюлазного комплексу гідролізувати кристалічний субстрат [37].

Вивчалась та порівнювалась ефективність ферментативного гідролізу МКЦ безклітинними культуральними рідинами *Cl. thermocellum* і *T. reesei* за оптимальними для кожної з них умовами [18]. Встановлено, що на початкових етапах гідролізу (~15 год) швидкість деструкції субстрату їхніми целюлазами майже однакова. При збільшенні тривалості гідролізу швидкість конверсії субстрату бактеріальними целюлазами зменшуються порівняно з грибними. Було показано, що ступінь деструкції субстрату бактеріальними целюлазами у більшому ступені залежить від питомої поверхні целюлози.

Недоліками бактерій *Cl. thermocellum* є висока чутливість до етанолу і у зв'язку з цим низький його вихід; а також відсутність здатності утилізувати пентози, які входять до складу геміцелюлоз [38]. Проведено дослідження прямої конверсії ялинової тирси,

повністю делігніфікованої методом електролізу, за допомогою кокультури термофільних анаеробних бактерій, яка включає целюлолітичні бактерії *Cl. thermocellum* F7 та сахаролітичні бактерії *Cl. thermohydrosulfuricum* 39E, здатні зброджувати гексози та пентози. Встановлено, що у порівнянні з монокультурами, у кокультурі спостерігався більш глибокий розклад тирси, підвищене утворення етанолу і газоподібних продуктів та зниження виходу ацетату. Кокультура має також підвищену КМЦ-азну активність, більшу швидкість росту та більший вихід біомаси [38]. А на прикладі бінарної культури *Cl. thermocellum* Z-53 і *Cl. thermoautotrophicum* Z-25 було показано, що у присутності термофільної гомоацетатної бактерії основним продуктом бродіння є оцтова кислота [39].

З культуральної рідини бактерій *Cl. thermocellum*, штаму LQRI, у гомогенному вигляді одержали ендоглюканазу. Вона значно більш термостабільна, ніж ендоглюканаза гриба *Tr. reesei* (період напівінактивації при 65°C 220 і 30 хв відповідно), вдвічі менш ефективно інгібується целобіозою і значно (у 4 – 5 разів) перевищує швидкість гідролізу МКЦ. Але рівень секреції целюлаз *Cl. thermocellum* досить низький і у сотні разів поступається рівню секреції целюлаз *Tr. reesei* [34]. Зроблений висновок, що ендоглюканаза *Cl. thermocellum*, штаму LQRI, може бути використанна для молекулярного клонування.

Особливо перспективними відносно термостабільних ферментів вважаються екстремально термофільні еубактерії, здатні розкладати целюлозу при температурах 80 – 85°C. В ряді робіт [25, 31, 40, 41] йдеться про екстремально термофільну облигатно анаеробну бактерію *Anaerocellum thermophilum* gen. nov., sp. nov., виділену з гейзерів Камчатки. Вивчено фізико-хімічних та біотехнологічних властивостей її енд-1,4-β-глюканази, а також компонента, дія якого лімітує гідроліз нерозчинної целюлози. Період напівінактивації першої при 95°C становить 4 хв, а при 85°C – 150 хв. Період напівінактивації другого компонента при 85°C – 250 хв [20]. За 4 доби культивування на 0,1 – 1,0 % КМЦ солюбілізується від 80 до 19 % субстрату (0,8 – 1,9 г/л), кінцевий рівень ендоглюканазної активності у цих умовах становить 0,017 – 0,013 МЕ/мл, відповідно [31]. Продуктивність виходу ендоглюканази дикого штаму *An. thermophilum* досить зівставна з величинами активностей диких штамів іншої термофільної бактерії *Cl. thermocellum*. Однак його рівень активності целюлаз за ФП (0,022 МЕ/мг) поступається аналогічним відомим результатам для інших продуцентів (штам 5 *Cl. thermocellum*, дикий штам термофільної бактерії *Acidothermus cellulolyticus*, термофільний актиноміцет *Thermomonospora fusca*, дикий штам мікроскопічного гриба *Tr. reesei* QM 6a – 0,06; 0,105; 0,15; 5,0 МЕ/мг) [25].

Целюлорозкладаючі біоценози відіграють велику роль у кругооберті вуглецю та інших біогенних елементів у мулах прісних та солених озер. В деяких роботах [42, 43] вивчається видовий склад мікроорганізмів целюлозолітичних біоценозів прісного озера Байкал. Вперше була показана можливість анаеробного розкладу целюлози в умовах граничної солоності [44, 45]. З гіперсолених лагун Арабатської коси і озера Сіваш ізольована нова целюлолітична облигатно анаеробна галофільна бактерія *Hallocella cellulolytica* [45]. Виділений штам Z-41 здатний розвиватися в умовах граничної солоності (аж до 25 % NaCl). Культура має ендоглюканазну активність того ж порядку активності, що і целюлази бактерій *Cl. thermocellum*. Оптимальна активність ендоглюканаз проявляється при рН 7,5 і концентрації NaCl у середовищі 0,5 М. Але оскільки дана бактерія – типовий мезофіл, термостабільність її ендоглюканази невелика: період напівінактивації за оптимальними умовами при 50°C становить 68 хв [45].

Целюлази бактеріальної природи поступаються грибним целюлазам за питомою активністю та кількістю екзогенного білку [18]. Суттєвим недоліком термофільних анаеробів також залишається поки що низький рівень біосинтезу целюлаз [25]. Ця проблема може вирішуватися з використанням методів фізіології, селекції та генетичної інженерії.

Промислова реалізація процесу ферментативної конверсії лігноцелюлозомісних матеріалів вимагає якісного покращання біотехнологічних та фізико-хімічних властивостей ферментів лігноцелюлазних комплексів, адаптованих до цих рослинних субстратів. Тому для дослідників, які працюють над цим питанням, проблема одержання продуцентів, здатних секретувати такі збалансовані комплекси з метою їх широкого використання або хоча б їх “покращенні” окремі компоненти для наступного клонування, залишається актуальною, перспективною галуззю досліджень у біотехнології.

1. Клесов А.А. Предисловие// *Итоги науки и техники. Сер. “Биотехнология”*. – 1988. – Том № 10. – С. 3 – 5. 2. Логинова Л.Г. Термостабильные целлюлазы и термофильные микроорганизмы // *Итоги науки и техники. Сер. “Биотехнология”*. – 1988. – Том № 10. – С. 72 – 96. 3. Нуцубидзе Н.Н., Тодоров П.Т., Квесидадзе Э.Г., Мазур Н.С. Сравнительная характеристика препаратов целлюлаз различного происхождения// *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1989. Том 24. – № 1. – С. 41 – 47. 4. Ахмедова З.Р., Белецкая О.П. Целлюлазы и лигниназы базидиомицетов// *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1993. Том 29. – № 6. – С. 823 – 827. 5. Ахмедова З.Р. Целлюлолитические, ксиланолитические и лигнолитические ферменты гриба *Pleurotus ostreatus*// *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1994. Том 30. – № 1. – С. 42 – 48. 6. Ахмедова З.Р., Белецкая О.П., Далимова Г.Н., Халикова М.М., Азимходжаева М.Н., Давранов К.Д., Шарипова А. Отбор и культивирование целлюлозо- и лигнинразрушающих грибов // *Микробиология*. – 1994. Том 63. – № 5. – С. 929 – 936. 7. Мясоедова Н.М., Леонтьевский А.А., Головлева Л.А. Утилизация гидролизного линина грибом белой гнили *Rapiz tigrinus* // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1995. Том 31. – № 5. – С. 505 – 509. 8. Семичаевский В.Д. Высшие базидиальные грибы – продуценты целлюлазных комплексов// *Итоги науки и техники. Сер. „Биотехнология”*. – 1988. – Том № 10. – С. 97 – 132. 9. Рабинович М.Р. Целлюлазы термофильных анаэробов// *Итоги науки и техники. Сер. “Биотехнология”*. – 1988. – Том № 10. – С. 207 – 219. 10. Квачадзе Л.Л., Кватадзе Н.Н., Квеситадзе Г.И. Термофильный штамм *Allescheria terrestris* – продуцент экзогенных целлюлаз// *Микробиология*. – 1989. Том 58. – № 3. – С. 462-466. 11. Кураков А.В., Болобова А.В., Анкело М. Поиск микроскопических грибов – продуцентов термостабильных целлюлаз // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1996. Том 32. – № 4. – С. 397 – 405. 12. Коломиец Э.И., Романовская Т.В., Здор Н.А., Вадецкий Б.Ю., Зайцев Г.М. Деградация различных видов лигнинов актиномицетом *Actinomyces flavascens*// *Микробиология*. – 1994. Том 63. – № 5. – С. 854 – 859. 13. Черноглазов В.М., Ермолова О.В., Перес Х., Шпанченко О.В., Гернет М.В. Контроль над биосинтезом множественных форм целлюлолитических ферментов при культивировании *Trichoderma longibrachiatum* // *Микробиология*. – 1990. Том 59. – № 2. – С. 257–264. 14. Курченко І.В., Жданова Н.М., Соколова О.В. Вивчення наявності деяких гідролітичних та окисно-відновних ферментів у штамів *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Snyd. et Hans., ізольованих з різних місць перебувань// *Мікробіол. журн.* – 2001. Том 63. – № 5. – С. 34–44.

15. Низовцева Д.В., Семёнов А.М., Паников Н.С. Целлюлазная активность торфяно-болотной почвы при различных температурах// Микробиология. – 1994. Том 63. – № 5. – С. 896–900. 16. Семёнов А.М., Низовцева Д.В., Паников Н.С. Влияние температуры и минеральных элементов на целлюлазную активность и развитие микромицетов в образцах торфа из верхового болота// Микробиология. – 1995. Том 64. – № 1. – С. 97–103. 17. Низовцева Д.В., Семёнов А.М., Паников Н.С. Влияние влажности на целлюлазную активность микроорганизмов в верховом торфе// Микробиология. – 1995. Том 64. – № 6. – С. 827–832. 18. Болобова А.В., Клесов А.А. Сравнение эффективности гидролиза микрокристаллической целлюлозы целлюлазами бактериального и грибного происхождения// Прикладная биохимия и микробиология. – 1990. Том 26. – № 3. – С. 321–327. 19. Назаренко А.В., Соколов В.Н., Гинак А.И., Острер Б.С. Биосинтез белка и ферментов целлюлолитического комплекса микромицетом *Aspergillus* sp. на кукурузной кочерыжке// Прикладная биохимия и микробиология. – 1993. Том 29. – № 3. – С. 437–441. 20. Коломиец Э. И., Романовская Т.В., Стахеев И.В., Гирис Д.А. Микробная деградация гидролизного лигнина// Микробиол. журн. – 1989. Том 51. – № 1. – С. 18–22. 21. Коломиец Э.И., Романовская Т.В., Здор Н.А. Физиологические потребности *Trichosporan cutaneum* при выращивании на гидролизном лигнине// Микробиол. журн. – 1990. Том 52. – № 1. – С. 38–42. 22. Элисашвили В.И. Биосинтез и свойства целлюлаз и ксиланаз высших базидиомицетов (Обзор)// Прикладная биохимия и микробиология. – 1993. Том 29. – № 3. – С. 340–353. 23. Элисашвили В.И., Глонти Н.М., Качлишвили Е.Т., Кикнадзе М.О., Тусишвили Х.А. Отбор высших базидиомицетов – продуцентов белка и ферментов// Прикладная биохимия и микробиология. – 1992. Том 28. – № 3. – С. 362–366. 24. Элисашвили В.И. Физиологическая регуляция лигнолитической активности высших базидиальных грибов// Микробиология. – 1993. Том 62. – № 5. – С. 801–816. 25. Тихомиров Д.Ф., Столбова В.В., Клесов А.А. Оптимизация биосинтеза эндо-1,4-β-глюканаз при культивировании экстремально-термофильной бактерии *Anaerocellum thertophilum*// Микробиология. – 1994. Том 63. – № 1. – С. 43–52. 26. Нуцубидзе Н.Н., Прабакаран К., Образцова Н.Н., Демина В.А., Юн Дек Су, Гернет М.В., Элисашвили В.И., Клесов А.А. Получение протопластов базидиомицетов *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* и дейтеромицетов *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum*// Прикладная биохимия и микробиология. – 1990. Том 26. – № 3. – С. 409–412. 27. Нуцубидзе Н.Н., Образцова И.Н., Демина В.А., Зверева Е.А. Получение протопластов базидиомицетов белой гнили и биохимические характеристики секретлируемых ферментных комплексов// Прикладная биохимия и микробиология. – 1992. Том 28. – № 3. – С. 409–415. 28. Ташпулатов Ж., Шульман Т.С., Байбаев Б.Г., Мирзарахимова М. Образование и регенерация протопластов у целлюлолитического активного гриба *Trichoderma harzianum* 19// Микробиология. – 1991. Том 60. – № 3. – С. 541–546. 29. Костюковский В.А., Окунев О.Н., Тараканов Б.В. Анаэробные целлюлолитические грибы рубца крупного рогатого скота// Микробиология. – 1990. Том 59. – № 6. – С. 1067–1073. 30. Лаптев Г.Ю. Взаимоотношения между популяциями целлюлолитических микроорганизмов при переваривании клетчатки содержимым рубца жвачных// Прикладная биохимия и микробиология. – 1995. Том 31. – № 4. – С. 441–446. 31. Тихомиров Д.Ф., Столбова В.В., Светличный В.А., Клесов А.А., Заварзин Г.А. Секреция эндо-1,4-β-глюканаз целлюлазного комплекса экстремально термофильной анаэробной

бактерии *Anaerocellum thermostophilum* gen. nov., sp. nov.// Прикладная биохимия и микробиология. – 1990. Том 26. – № 2. – С. 252–259. 32. Клёсов А.А., Ермолова О.В., Черноглазов В.М., Логинова Л.Г., Гужова Э.П. Термостабильная эндо-1,4-β-глюканаза из *Myceliophthora thermosthila*: очистка и характеристики// Прикладная биохимия и микробиология. – 1987. Том 23. – № 1. – С. 44–55. 33. Черноглазов В.М., Ермолова О.В., Джафарова А.Н. и др. Выделение, очистка и субстратная специфичность высокотермостабильной эндо-1,4-β-глюканазы из *Myceliophthora thermosthila*// Биохимия. – 1988.–Том 53. – № 3. – С. 475–482. 34. Клесов А.А., Нуцубидзе Н.Н., Тодоров П.Т. Эндо-1,4-β-глюканаза (целлюлаза) из термофильной бактерии *Clostridium thermocellum*// Прикладная биохимия и микробиология. – 1988. Том 24. – № 1. – С. 28–34. 35. Болобова А.В., Корнилова И.Г., Симанькова М.В., Клесов А.А. Целлюлазы *Clostridium thermocellum*// Прикладная биохимия и микробиология. – 1988. Том 24. – № 3. – С. 342–352. 36. Ермолова О.В., Болобова А.В., Корнилова И.Г., Головченко Н.П., Клесов А.А. Характеристика эндоглюканазной фракции *Clostridium thermocellum*, штамм Ф7// Прикладная биохимия и микробиология. – 1988. Том 24. – № 5. – С. 622–629. 37. Тихомиров Д.Ф., Столбова В.В., Клесов А.А. Эндо-1,4-β-глюканазы из анаэробной бактерии *Clostridium thermocellum* штамм № 3 с высокой термостабильностью// Прикладная биохимия и микробиология. – 1989. Том 25. – № 1. – С. 48–55. 38. Белокопытов Б.Ф., Щербакова В.А., Акименко В.К. Биоконверсия опилок, делигнифицированных методом электролиза, кокультурой бактерий *Clostridium thermocellum* и *Clostridium thermohydrosulfuricum*// Прикладная биохимия и микробиология. – 1990. Том 26. – № 2. – С. 195–201. 39. Симанькова М.В., Ножневникова А.Н. Термофильное гомоацетатное сбраживание целлюлозы комбинированной культурой *Clostridium thermocellum* и *Clostridium thermoautotrophicum*// Микробиология. – 1989. Том 58. – № 6. – С. 897–903. 40. Светличный В.А., Светличная Т.П., Черных Н.А., Заварзин Г.А. *Anaerocellum thermostophilum* gen. nov., sp. nov. – экстремально термофильная целлюлолитическая зубактерия из горячих источников долины гейзеров// Микробиология. – 1990. Том 59. – № 5. – С. 871–879. 41. Тихомиров Д.Ф., Столбова В.В., Светличный В.А., Клесов А.А. Высокотермостабильный целлюлазный комплекс новой экстремально термофильной бактерии *Anaerocellum thermostophilum*// Прикладная биохимия и микробиология. – 1992. Том 28. – № 3. – С. 339–347. 42. Намсараев Б.Б., Дулов Л.Е., Земская Т.И. Разложение целлюлозы в донных осадках озера Байкал// Микробиология. – 1995. Том 64. – № 4. – С. 43. Луста К.А., Намсараев Б.Б. Целлюлолитические микробные ассоциации донных осадков пресного озера// Микробиология. – 1988. Том 57. – № 5. – С. 835–840. 44. Симанькова М.В., Заварзин Г.А. Анаэробное разложение целлюлозы в озере Сиваш и гиперсолёных лагунах Арабатской косы// Микробиология. – 1992. Том 61. – № 2. – С. 288–293. 45. Болобова А.В., Симанькова М.В., Маркович Н.А. Целлюлазный комплекс новой галофильной бактерии *Hallosella cellulolytica*// Микробиология. – 1992. Том 61. – № 5. – С. 804–811.