

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ И МОНООКСИГЕНАЗНЫХ ЦЕЛЛЮЛАЗ В ПРОЦЕССЕ ФЕРМЕНТИРОВАНИЯ СМЕСЕЙ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОСТАТКОВ И ОТРАБОТАННОГО ПОЧВЕННОГО СУБСТРАТА

О. А. Борцова, В. И. Дубовицкая, В. Е. Вертебный, Ю. В. Хомяков, Г. Г. Панова, А. С. Галушко

ФГБНУ «Агрофизический научно-исследовательский институт»

195220, Санкт-Петербург, Гражданский пр., д. 14

E-mail: lirinaoa@gmail.com; galushkoas@inbox.ru

Поступила в редакцию 04 сентября 2018 г., принята к печати 26 ноября 2018 г

Приведены результаты исследования динамики активности гидролитических и монооксигеназных целлюлаз в процессе длительного инкубирования смесей растительных остатков и отработанного органо-минерального субстрата, который использовался для выращивания растений в регулируемых агроэкосистемах. Установлено, что активность гидролитических ферментов уменьшилась в первый месяц инкубации и в дальнейшем не изменялась. Впервые были получены данные по целлюлазной активности полисахаридмонооксигеназ в процессе ферментирования смесей растительных остатков и отработанного органо-минерального субстрата. Процесс изменения активности оксигеназных целлюлаз можно разделить на несколько фаз: 1) уменьшения активности (две недели); 2) стабильной низкой активности (две недели); 3) увеличения активности (через пять недель инкубации). Внесение культур микроорганизмов, разрушающих целлюлозу, не оказало заметного влияния на активность исследуемых целлюлаз. Возможно, грунто–растительные смеси были обеднены субстратами, которые могли быть использованы штаммами микроорганизмов для роста и продуцирования целлюлаз. Кроме того, активность монооксигеназных целлюлаз могла быть лимитирована недостатком Cu^{2+} . В связи с этим представляют актуальность выявление микроорганизмов, которые были активными в условиях проведенного эксперимента, и оптимизация микроэлементного состава грунто–растительных смесей.

Ключевые слова: растительные остатки, целлюлозолитические ферменты, целлюлаза, полисахаридмонооксигеназы, ПМО, подвижные формы меди, отработанный органо-минеральный субстрат, грунто–растительная смесь, ферментирование.

TEMPORAL ACTIVITY DYNAMICS OF HYDROLYTIC AND LYTIC MONOOXYGENASES CELLULASES DURING LONG-TERM FERMENTATION OF MIXTURES OF PLANT RESIDUES WITH EXHAUSTED AGRICULTURAL SOIL OF AGROPHYTOCOMPLEXES

O. A. Bortsova, V. I. Dubovitskaya, V. E. Vertebnyi, Yu. V. Khomyakov, G. G. Panova, A. S. Galushko

Agrophysical Research Institute

Grazhdanskiy pr. 14, Saint-Petersburg, 195220, Russia

lirinaoa@gmail.com, galushkoas@inbox.ru

Temporal activity dynamics of hydrolytic and lytic monooxygenases cellulases during long-term incubation of mixtures of plant residues with exhausted agricultural soil of agrophytocomplexes was investigated. The activity of hydrolytic cellulases decreased within first month of incubation and did not change later on. The cellulase activity of lytic polysaccharide monooxygenases in such a system was investigated for the first time. The dynamics of activity of these cellulases showed several phases. At the beginning the activity decreased (2 weeks), then it stayed low (2 weeks) and after that the activity increased (after 5 weeks) and stayed rather stable until the end of the incubation. Introduction of cells of cellulolytic bacteria strains into cultivated mixtures did not have any effect on the dynamics of activity of cellulases. It is possible to assume that the plant residues – exhausted soil mixtures were not enriched in substrates that could be utilized by introduced strains of bacteria for growth and cellulases production. In addition, activity of lytic polysaccharide monooxygenases could be limited by the lack of available Cu_2^+ . Further study would concentrate on the search of cellulolytic bacteria that were active during incubation of the mixtures and on the optimization of trace elements composition of plant residues – exhausted soil mixtures.

Key words: plant residues, cellulases, available Cu_2^+ , exhausted soil, incubation.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема утилизации непищевого растительного сырья на сегодняшний день остается весьма актуальной для сельскохозяйственного производства в России. Особенно это касается растительных остатков в растениеводстве защищенного грунта. Традиционные методы их переработки (сжигание и складирование) являются неэкономичными и неэкологичными. Наиболее природоподобным и перспективным способом переработки растительных остатков является биоконверсия (компостирование и ферментирование). Биоконверсия целлюлозосодержащего сырья может осуществляться как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Как правило, основными ферментативными реакциями, регулирующими данный процесс, являются реакции инициации разрушения целлюлозы. Однако одно из препятствий для эффективной переработки растительных остатков заключается в том, что их основной компонент – целлюлоза — является трудноразлагаемым полимером, устойчивым к различным воздействиям. Целлюлоза обладает высокой степенью кристалличности, которая коррелирует с эффективностью ферментативного гидролиза. Кристаллические области субстрата более устойчивы к различным воздействиям. Более полной и быстрой переработке отходов может способствовать искусственная интродукция микроорганизмов, обладающих ферментами целлюлазного комплекса. В связи с этим представляется актуальным поиск штаммов микроорганизмов, способных продуцировать различные целлюлозолитические ферменты.

К настоящему времени накоплен большой объем знаний о разложении целлюлозы литическими ферментами. Для разрушения целлюлозы до мономера (глюкозы) необходимо взаимодействие нескольких целлюлозолитических ферментов, продуцируемых разными видами микроорганизмов. Классическая схема процесса деградации целлюлозы отражает синергетическое действие нескольких типов ферментов — эндоглюканазы (эндо-1,4-β-глюканазы), экзоглюканазы (экзо-1,4-β-глюканазы) и β-гликозидазы, различающихся по характеру действия на молекулы целлюлозы. На основе классической схемы разработаны биологические препараты для интенсификации процесса биоконверсии целлюлозосодержащего сырья. Эффективность деградации такого сырья принято оценивать по значениям целлюлазной активности — общей (Селивановская и др., 2007), а также активности каждого типа ферментов целлюлазного комплекса (Определение активности ферментов, 2003).

В 2010–2011 гг. были открыты новые ферменты, осуществляющие окислительную деструкцию природных полисахаридов и названные литическими полисахаридмонооксигеназами (ПМО) (Vaaje-Kolstad et al., 2010). Некоторые грибы и бактерии являются продуцентами ПМО. Полисахаридмонооксигеназы осуществляют окислительную деструкцию целлюлозы по радикальному механизму, и для их функционирования, как правило, необходимо наличие

молекулярного кислорода и донора электронов (Horn et al., 2012). При этом данные ферменты эффективно воздействуют как на аморфные, так и на кристаллические области молекулы целлюлозы (Kracher et al., 2016). В качестве доноров электронов для определения активности ферментов *in vitro* используются органические соединения (например, аскорбиновая, галловая и кофейная кислоты) (Frommhagen et al., 2016) и ферменты (например, целлобиозодегидрогеназа) (Phillips et al., 2011; Bulakhov et al., 2017).

В последнее время проводятся интенсивные исследования по изучению ПМО как компонентов ферментных комплексов, продуцируемых микроскопическими грибами, оценке эффективности деструкции целлюлозосодержащих материалов при введении ПМО в состав препарата целлюлаз, а также влиянию донора электронов на данный процесс (Чекушина, 2013; Булахов и др., 2016; Bulakhov et al., 2017). Также в литературе приводятся данные по изучению бактериальных целлюлаз оксигеназной природы (Forster et al., 2018). Динамика гидролитической целлюлазной активности в процессе компостирования изучалась многими исследователями (Селивановская и др., 2007; Будаева и др., 2008), тогда как информации об изучении ПМО целлюлозолитического действия при проведении компостирования и ферментирования в литературных источниках не найдено. В 2018 г. опубликовано исследование по изучению в кратковременных лабораторных экспериментах (восемь суток) изменения экспрессии генов гидролитических и ПМО целлюлаз в сообществе пяти видов бактерий, разлагающих остатки сахарного тростника (Jiménez et al., 2018). Однако активность ферментов в рамках данного исследования не определялась.

Целью настоящей работы являлось исследование динамики активности гидролитических и монооксигеназных целлюлаз в процессе длительного инкубирования смесей растительных остатков и отработанного органо-минерального субстрата, который использовался для выращивания растений в регулируемых агроэкосистемах (Панова и др., 2015). Цель исследования определила следующие задачи: проведение ферментирования растительных остатков с отработанным субстратом; определение целлюлазной активности ферментов микроорганизмов как деструкторов растительных остатков в процессе ферментирования; изучение влияния внесения культур бактерий, продуцирующих как гидролитические целлюлазы, так и ферменты ПМО целлюлозолитического действия.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Инкубирование грунто-растительной смеси (ГРС) массой по 5 кг осуществлялось в ёмкостях объемом 30 л (лабораторных ферментерах), обернутых термоизоляционным материалом. В состав инкубируемого материала входили растительные остатки огурца, томата и редиса (стебли с листьями) и отработанный органо-минеральный субстрат на основе верхового торфа низкой степени разложения в массовом соотношении 10:22. Последний был

получен после выращивания на нем растений на биополигоне для интенсивных круглогодичных исследований в регулируемых условиях (Панова и др., 2015). Высушенные и измельченные растительные остатки и отработанный субстрат помещались в ферментеры слоями. Влажность инкубируемых смесей поддерживалась на уровне 60–75%. В процессе инкубирования смеси периодически перемешивались, также проводилось измерение температуры окружающей среды и ферментируемых смесей.

Отбор проб для анализа проводился непосредственно после закладки компостных смесей, затем на 7-е, 14-е, 21-е, 28-е, 35-е, 49-е и 249-е сутки компостирования.

Биодобавки, используемые в опыте, представляли собой культуральные жидкости штаммов бактерий, выделенных по стандартным методикам (Практикум по микробиологии, 2005) и в элективных условиях для обнаружения продуцентов ПМО из зрелого компоста, а также с поверхности растений, под номерами 5-М и ПР-3 соответственно. Нарботка культуральной жидкости осуществлялась на среде М9 (Миллер, 1976) в колбах Эрленмейера в условиях принудительной аэрации. Биодобавки вносились в заполненные ГРС ферментеры в четырёх вариантах: № 1 – 5-М; № 2 – 5-М + ПР-3; № 3 – ПР-3; № 4 – контроль. Биодобавка составляла 17% от массы компостируемой смеси. В контрольном варианте вместо добавки была внесена жидкая питательная среда (Миллер, 1976).

Целлюлазная активность ферментов в культурах бактерий и пробах ГРС была определена при помощи классических методов выявления гидролитических ферментов (Определение активности ферментов, 2003; Практикум по микробиологии, 2005) и с добавлением в реакционную смесь 5 ммоль/л донора электронов (аскорбиновой и галловой кислот) (Frommhagen et al., 2016). В последнем случае определялась целлюлозолитическая скорость ПМО. Активность разложения целлюлозы оценивалась по скорости образования редуцирующих сахаров.

Содержание органического вещества и общего азота в ГРС определялось по общепринятым методикам (Справочник по анализу органических удобрений, 2000).

Определение общего содержания меди и ее подвижных форм проводилось при помощи стандартных методов, описанных в ГОСТ Р 53218-2008 и в Методических указаниях по определению тяжелых металлов (1992) соответственно.

Статистическая обработка результатов измерений производилась с помощью электронных таблиц Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате мониторинга процесса ферментирования смесей растительных остатков с отработанным почвенным субстратом было выявлено следующее.

Внесение целлюлозолитических бактерий в ГРС не оказало существенного влияния на развитие и протекание изучаемых микробиологических процессов в смесях, поэтому в настоящем исследовании приводятся усредненные данные по четырём ферментерам (рис. 2, 3).

В первые семь дней инкубирования смесей температура содержимого контейнеров увеличилась до максимального уровня в 32–35°C, затем снизилась и после 12-ти суток варьировалась в пределах 20–23°C. После двух месяцев инкубирования смесей температура в контейнерах уменьшилась до 15–16°C. Динамика разности температуры окружающего воздуха и ГРС показана на рис. 1. В начальный период эксперимента (10–12 дней) температура смесей была на 12–15°C выше, чем температура окружающего воздуха. В дальнейшем нагрев смесей уменьшился, и разность температур в интервале составляла около 4°C в течение 12–26 суток эксперимента. После этого температура смесей снизилась и в течение 30 дней превышала температуру воздуха примерно на 2°C. В конце инкубирования температура ГРС не отличалась от температуры окружающего воздуха.

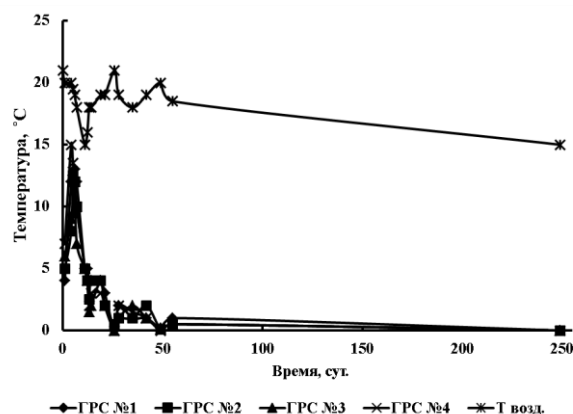


Рис. 1. Динамика изменения разности температуры в ферментерах и температуры воздуха в помещении, в котором проводился эксперимент

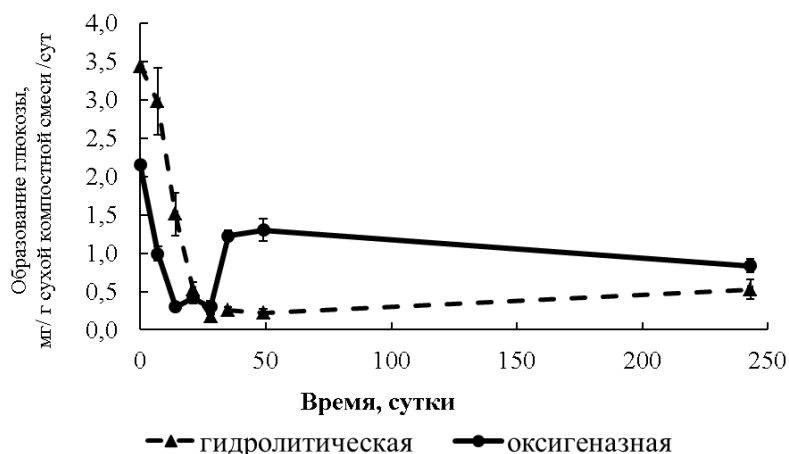


Рис. 2. Результаты мониторинга целлюлазной активности в инкубируемых ГРС (средние значения для четырёх ферментеров)

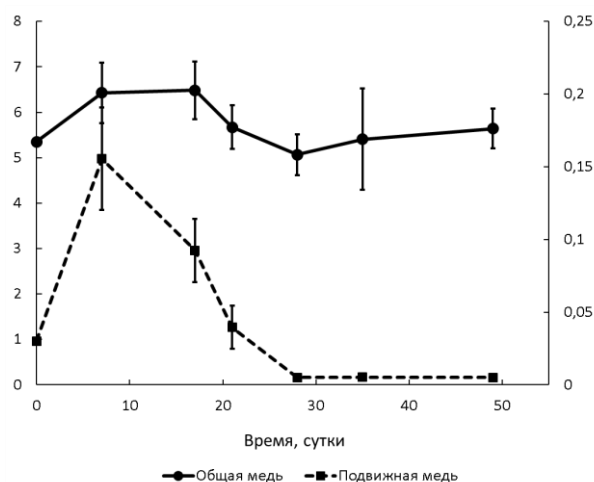


Рис. 3. Динамика общего содержания ионов меди и ее подвижных форм (средние значения для четырёх ферментеров). Левая ось y – общее содержание меди (мг/кг сухого веса ГРС); правая ось y – содержание подвижных форм меди (мг/кг сухого веса ГРС); ось x – сутки инкубации

Выделение тепла аэробными и анаэробными микроорганизмами тесно связано с процессами роста при периодическом культивировании бактерий (Winkelmann et al., 2004; Maskow et al., 2010). В рамках настоящего исследования интенсивность протекания микробиологических процессов оценивалась на основе разности температур ГРС и окружающей среды (рис. 1). Разогрев смесей в начале эксперимента (10–12 дней) свидетельствовал о наибольшей активности микроорганизмов в указанный период. По всей видимости, в первые 10–12 дней происходило разложение низкомолекулярных соединений (моносахаридов, органических кислот и др.). Поскольку используемые в эксперименте растительные остатки обычно содержат незначительное количество таких веществ, интенсивность и продолжительность процесса разложения в начале инкубирования смесей были

сравнительно невысокими, что не способствовало более существенному увеличению температуры, наблюдаемому при компостировании. В дальнейшем активность микроорганизмов снизилась, а температура в контейнерах постепенно сравнялась с температурой окружающей среды. Возможно, что на данном этапе были активны микроорганизмы, которые медленно метаболизировали трудноразлагаемые органические вещества ГРС.

Содержание органического вещества в ферментируемых смесях составило в среднем 56–64% от сухого веса ГРС и в процессе инкубирования существенно не изменилось. Содержание азота в различных вариантах составляло 3–6% от сухого веса ГРС, за 49 дней наблюдений была отмечена незначительная тенденция к его повышению, что может быть обусловлено медленным развитием процесса азотфиксации.

Анализ целлюлазной активности ферментов гидролитического и оксигеназного типов в компостируемых смесях показал, что ее уровень сильно изменялся в процессе ферментирования (рис. 2). В исходной смеси активность данных ферментов составила 3,4 и 2,2 мг глюкозы/г сухого веса ГРС/сутки соответственно. Наиболее высокие показатели интенсивности гидролитического разложения целлюлозы (на уровне 3,0–3,5 мг глюкозы г⁻¹ сухой ГРС сутки⁻¹) отмечены в течение первой недели. После этого было установлено постепенное снижение скорости гидролиза целлюлозы до 0,2 мг глюкозы г⁻¹ сухой ГРС сутки⁻¹. В дальнейшем активность гидролитического комплекса оставалась на указанном уровне до конца измерений.

Активность целлюлазного комплекса с участием ПМО во всех вариантах также была максимальной в начале процесса и составляла 60–70% от гидролитической активности. На 14-е сутки наблюдений активность оксигеназного разрушения целлюлозы уменьшилась и оставалась на уровне 0,3–0,4 мг глюкозы г⁻¹ сухой ГРС сутки⁻¹ в течение последующих двух недель. К концу первого месяца наблюдений показатели активности целлюлаз были весьма близки. Однако через пять недель активность ПМО комплекса значительно увеличилась.

Измерение целлюлазной активности на 249-й день ферментирования показало, что в смесях присутствовали активные целлюлазы как гидролитического, так и оксигеназного действия, причем показатели активности ПМО составили 160% по отношению к показателям гидролитической активности.

Сопоставление температуры в ферментерах и динамики активности целлюлазных комплексов в течение 49-ти дней инкубирования показало, что только активность целлюлазы с участием ПМО зависела от изменений разницы между температурой смесей и воздуха и, соответственно, от интенсивности микробиологических процессов. Динамика активности гидролитического разложения целлюлазы совпадала с динамикой температуры ГРС только в 1-й месяц наблюдений.

Все ферменты, разрушающие целлюлозу с участием молекулярного кислорода, являются металлосодержащими ферментами, они содержат один атом Cu²⁺ в активном центре (Quinlan et al., 2011). В связи с этим в рамках настоящего исследования представляло интерес проследить динамику содержания ионов меди в ГРС. Полученные данные представлены на рис. 3. Общее содержание ионов меди в течение 49-ти дней эксперимента изменилось незначительно и варьировалось в пределах 5–7 мг кг⁻¹ сухого веса ГРС. Содержание подвижных форм ионов меди на седьмые сутки эксперимента было максимальным и составило 2,4 вес. % от общего содержания меди, а через четыре недели инкубирования ГРС уменьшилось до предела обнаружения (< 5 мкг кг⁻¹ сухого веса ГРС, менее 0,01 вес. % от общего содержания меди). Можно прийти к выводу, что очень низкое содержание растворенных ионов меди после месяца инкубирования могло ограничить ускорение процесса

разложения целлюлозосодержащих соединений оксигеназными целлюлазами. По всей видимости, целлюлазная оксигеназная реакция в ферментерах не была лимитирована молекулярным кислородом из-за невысокой микробиологической активности.

В настоящее время в литературе о ПМО доминирует мнение, что оксигеназные ферменты вступают в синергетические взаимодействия с другими типами целлюлаз. Увеличение активности ПМО ферментов значительно ускоряет суммарное разложение целлюлозы в смесях ПМО и гидролитических целлюлаз (Булахов и др., 2016; Eibinger et al., 2014). Однако в настоящем исследовании установлено, что в исходной ГРС и в течение первых четырех недель инкубирования целлюлазная активность без добавления донора электронов была выше, чем та же активность при его добавлении. Можно предположить, что в более сложных природных сообществах микроорганизмов могут происходить и другие взаимодействия компонентов целлюлазного комплекса, например такие, как конкурирование за целлюлозный субстрат, или активизация ПМО, осуществляющих начальную атаку на молекулы целлюлозы, что вызывает необходимость приспособления всех остальных компонентов целлюлазного комплекса для успешного разложения целлюлозы. Такое соотношение активности различных типов целлюлаз выявлено впервые и требует дальнейших исследований.

Таким образом, исследована динамика активности целлюлазного комплекса ферментов с участием оксигеназных и гидролитических ферментов при длительном инкубировании ГРС. Установлено, что активность гидролитических ферментов уменьшилась в первый месяц инкубации и в дальнейшем не изменялась. Процесс изменения активности оксигеназных целлюлаз можно разделить на несколько фаз: 1) уменьшения активности (две недели); 2) стабильной низкой активности (две недели); 3) увеличения активности (через пять недель инкубации).

Внесение культур микроорганизмов, разрушающих целлюлозу, не оказало заметного влияния на активность исследуемых целлюлаз. Возможно, что ГРС были обеднены субстратами, которые могли быть использованы штаммами микроорганизмов для роста и продуцирования целлюлаз. В связи с этим представляется актуальным выявление микроорганизмов, которые были активными в условиях проведенного эксперимента.

Исследования проводились в рамках госзадания N 0667-2018-0001 и при частичной поддержке Фонда содействия инновациям (грант № 10859ГУ/2016).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Будаева В. В., Митрофанов Р. Ю., Золотухин В. Н. Исследование ферментативного гидролиза отходов переработки злаков // Ползуновский вестник. 2008. № 3. С. 322–327.
- Булахов А. Г., Гусаков А. В., Чекушина А. В., Короткова О. Г. Получение гомогенных полисахаридмонооксигеназ из грибных источников и изучение их синергизма с целлюлазами при действии на целлюлозу // Биохимия. 2016. № 5. С. 701–709.
- ГОСТ Р 53218-2008 Удобрения органические. Атомно-абсорбционный метод определения содержания тяжелых металлов. М.: Стандартинформ, 2009.
- Методические указания по определению тяжелых металлов в почвах с/х угодий и продукции растениеводства. ЦИНАО, 1992.
- Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 436 с.
- Полыгалина Г. В., Чердниченко В. С., Римарева Л. В. Определение активности ферментов. Справочник. М.: ДеЛи принт, 2003.
- Практикум по микробиологии / Под ред. А. И. Нетрусова. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.
- Селивановская С. Ю., Ярлыченко С. А., Латыпова В. З. Влияние биологических добавок на процесс компостирования органической фракции ТБО и удобрительные свойства компостов // Агрохимия. 2007. № 8. С. 58–63.
- Панова Г. Г., Черноусов И. Н., Удалова О. Р., Александров А. В., Карманов И. В., Аникина Л. М., Судаков В. Л., Якушев В. П. Научно-технические основы круглогодичного получения высоких урожаев качественной растительной продукции при искусственном освещении // Доклады РАСХН. 2015. № 4. С. 17–21.
- Справочник по анализу органических удобрений. Ч. 1. Методы агрохимического анализа органических удобрений. М.: МСХ РФ, 2000. 220 с.
- Чекушина А. В. Целлюлолитические ферментные препараты на основе грибов *Trichoderma*, *Penicillium* и *Myceliophthora* с увеличенной гидролитической активностью. Автореф. дисс. канд. хим. наук. М., 2013.
- Bulakhov A. G., Volkov P. V., Rozhkova A. M., Gusakov A. V., Nemashkalov V. A., Satrutdinov A. D., Sinitsyn A. P. Using an inducible promoter of a gene encoding *Penicillium verruculosum* glucoamylase for production of enzyme preparations with enhanced cellulase performance // PLoS ONE, 2017, v. 12, no. 1. DOI: e0170404-e0170404.
- Eibinger M., Ganner T., Bubner P., Rošker S., Kracher D., Haltrich D., Ludwig R., Plank H., Nidetzky B. Cellulose surface degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency // J. Biol. Chem., 2014, v. 289, no. 52, pp. 35929–35938. DOI: 10.1074/jbc.M114.602227.
- Forsberg Z., Bissaro B., Gullesen J., Dalhus B., Vaaje-Kolstad G., Eijsink V. G. H. Structural determinants of bacterial lytic polysaccharide monooxygenase functionality // J. Biol. Chem., 2018, v. 293, no. 4, pp. 1397–1412. DOI: 10.1074/jbc.M117.817130.
- Frommhagen M., Koetsier M. J., Westphal A. H., Visser J., Hinz S. W. A., Vincken J.-P., van Berkel W. J. H., Kabel M. A., Gruppen H. Lytic polysaccharide monooxygenases from *Myceliophthora thermophila* C1 differ in substrate preference and reducing agent specificity // Biotechnology for Biofuels, 2016, no. 9, 186 p.
- Horn S. J., Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Eijsink V. G. Novel enzymes for the degradation of cellulose // Biotechnology for Biofuels, 2012, no. 5, pp. 45.
- Jiménez D. J., Chaib De Mares M., Salles J. F. Temporal Expression Dynamics of Plant Biomass-Degrading Enzymes by a Synthetic Bacterial Consortium Growing on Sugarcane Bagasse // Front Microbiol, 2018, no. 9, 299 p. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00299.
- Kracher D., Scheiblbrandner S., Felice A. K. G., Breslmayr E., Preims M., Ludwicka K., Haltrich D., Eijsink V. G., Ludwig R. Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation // Science, 2016, v. 352, no. 6289, pp. 1098–1101.
- Maskow T., Kemp R., Buchholz F., Schubert T., Kiesel B., Harms H. What heat is telling us about microbial conversions in nature and technology: from chip- to megacalorimetry // Microb. Biotechnol., 2010, no. 3, pp. 269–284. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2009.00121.x.
- Phillips C. M., Beeson W. T., Cate J. H., Marletta M. A. Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa* // ACS Chem. Biol., 2011, no. 6, pp. 1399–1406.
- Quinlan R.J., Sweeney M.D., Lo Leggio L., Otten H., Poulsen J.C., Johansen K.S., Krogh K.B., Jørgensen C.I., Tovborg M., Anthonsen A., Tryfona T., Walter C.P., Dupree P., Xu F., Davies G.J., Walton P.H. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011, v. 108, no. 37, pp. 15079–15084. DOI: 10.1073/pnas.1105776108.
- Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Horn S. J., Liu Z., Zhai H., Sørlie M., Eijsink V. G. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides // Science, 2010, v. 330, pp. 219–222.
- Winkelman M., Huttel R., Wolf G. Application of batch-calorimetry for the investigation of microbial activity // Thermochim. Acta, 2004, v. 415, pp. 75–82. DOI: 10.1016/j.tca.2003.08.028.

REFERENCES

- Budaeva V. V., Mitrofanov R. Iu., Zolotukhin V. N. Issledovanie fermentativnogo gidroliza otkhodov pererabotki zlakov [Investigation of fermentative hydrolysis of waste of cereal processing] // *Polzunovskii vestnik*, 2008, no. 3, pp. 322–327.

- Bulakhov A. G., Gusakov A. V., Chekushina A. V., Korotkova O. G. Poluchenie gomogennykh polisakharidmonooksigenaz iz gribnykh istochnikov i izuchenie ikh sinergizma s tselliulazami pri deistvii na tselliulozu [Isolation of homogeneous polysaccharide monooxygenases from fungal sources and investigation of their synergism with cellulases when acting on cellulose] // *Biokhimiia*, 2016, no. 5, pp. 701–709.
- GOST R 53218-2008 *Udobreniia organicheskie. Atomno-absorbtsionnyi metod opredeleniia soderzhaniia tiazhelykh metallov* [Organic fertilisers. Atomic-absorption method for determination of the heavy metals content]. Moscow: Standartinform, 2009.
- Metodicheskie ukazaniia po opredeleniiu tiazhelykh metallov v pochvakh s/kh ugodii i produktsii rastenievodstva [Methods for determination of heavy metals in agricultural soils and plants]. TsINAo, 1992.
- Miller Dzh. *Eksperimenty v molekuliarnoi genetike* [Experiments in molecular genetics]. Moscow: Mir, 1976. 436 p.
- Polygalina G. V., Cherednichenko V. S., Rimareva L. V. *Opredelenie aktivnosti fermentov* [Determination of enzymes activity]. Spravochnik. Moscow: DeLi print, 2003.
- Praktikum po mikrobiologii* [Microbiological methods] / Pod red. A. I. Netrusova. Moscow: Publishing house «Akademiia», 2005. 608 p.
- Selivanovskaia S. Iu., Iarlychenko S. A., Latypova V. Z. Vliianie biologicheskikh dobavok na protsess kompostirovaniia organicheskoi fraktsii TBO i udobritel'nye svoistva kompostov [Influence of organic supplements on composting of organic fraction of TBO and fertilizing compost properties] // *Agrokhiimiia*, 2007, no. 8, pp. 58–63.
- Panova G. G., Chernousov I. N., Udalova O. R., Aleksandrov A. V., Karmanov I. V., Anikina L. M., Sudakov V. L., Iakushev V. P. Nauchno-tekhniccheskie osnovy kruglogodichnogo polucheniia vysokikh urozhaev kachestvennoi rastitel'noi produktsii pri iskusstvennom osveshchenii [Scientific and technical basis of year-round obtaining high yields of high-quality plant products under artificial lighting] // *Doklady RASKhN*, 2015, no. 4, pp. 17–21.
- Spravochnik po analizu organicheskikh udobrenii. Ch. 1. Metody agrokhiimicheskogo analiza organicheskikh udobrenii [Methods of agrochemical analysis of organic fertilizers]. Moscow: MSKh RF, 2000. 220 p.
- Chekushina A. V. Tselliuloliticheskie fermentnye preparaty na osnove gribov *Trichoderma*, *Penicillium* i *Myceliophthora* s uvelichennoi gidroliticheskoi aktivnost'iu. Avtoref. diss. kand. khim. nauk [Cellulolytic fermentative preparates on the basis of fungi *Trichoderma*, *Penicillium* and *Myceliophthora* with increased activity of hydrolysis. Abstract diss. cand. kh. sci.]. Moscow, 2013.
- Bulakhov A.G., Volkov P.V., Rozhkova A.M., Gusakov A.V., Nemashkalov V.A., Satrutdinov A.D., Sinitsyn A.P. Using an inducible promoter of a gene encoding *Penicillium verrucosum* glucoamylase for production of enzyme preparations with enhanced cellulase performance // *PLoS ONE*, 2017, v. 12, no. 1. DOI: e0170404-e0170404.
- Eibinger M., Ganner T., Bubner P., Rošker S., Kracher D., Haltrich D., Ludwig R., Plank H., Nidetzky B. Cellulose surface degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency // *J. Biol. Chem.*, 2014, v. 289, no. 52, pp. 35929–35938. DOI: 10.1074/jbc.M114.602227.
- Forsberg Z., Bissaro B., Gullesen J., Dalhus B., Vaaje-Kolstad G., Eijsink V. G. H. Structural determinants of bacterial lytic polysaccharide monooxygenase functionality // *J. Biol. Chem.*, 2018, v. 293, no. 4, pp. 1397–1412. DOI: 10.1074/jbc.M117.817130.
- Frommhagen M., Koetsier M. J., Westphal A. H., Visser J., Hinz S. W. A., Vincken J.-P., van Berkel W. J. H., Kabel M. A., Gruppen H. Lytic polysaccharide monooxygenases from *Myceliophthora thermophila* C1 differ in substrate preference and reducing agent specificity // *Biotechnology for Biofuels*, 2016, no. 9, 186 p.
- Horn S. J., Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Eijsink V. G. Novel enzymes for the degradation of cellulose // *Biotechnology for Biofuels*, 2012, no. 5, pp. 45.
- Jiménez D. J., Chaib De Mares M., Salles J. F. Temporal Expression Dynamics of Plant Biomass-Degrading Enzymes by a Synthetic Bacterial Consortium Growing on Sugarcane Bagasse // *Front Microbiol*, 2018, no. 9, 299 p. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00299.
- Kracher D., Scheiblbrandner S., Felice A. K. G., Breslmayr E., Preims M., Ludwiczka K., Haltrich D., Eijsink V. G., Ludwig R. Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation // *Science*, 2016, v 52, no. 6289, pp. 1098–1101.
- Maskow T., Kemp R., Buchholz F., Schubert T., Kiesel B., Harms H. What heat is telling us about microbial conversions in nature and technology: from chip- to megacalorimetry // *Microb. Biotechnol.*, 2010, no. 3, pp. 269–284. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2009.00121.x.
- Phillips C. M., Beeson W. T., Cate J. H., Marletta M. A. Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa* // *ACS Chem. Biol.*, 2011, no. 6, pp. 1399–1406.
- Quinlan R. J., Sweeney M. D., Lo Leggio L., Otten H., Poulsen J. C., Johansen K. S., Krogh K. B., Jørgensen C. I., Tovborg M., Anthonsen A., Tryfona T., Walter C. P., Dupree P., Xu F., Davies G. J., Walton P. H. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, v. 108, no. 37, pp. 15079–15084. DOI: 10.1073/pnas.1105776108.
- Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Horn S. J., Liu Z., Zhai H., Sørlie M., Eijsink V. G. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides // *Science*, 2010, v. 330, pp. 219–222.
- Winkelmann M., Huttel R., Wolf G. Application of batch-calorimetry for the investigation of microbial activity // *Thermochim. Acta*, 2004, v. 415, pp. 75–82. DOI: 10.1016/j.tca.2003.08.028.