



<https://doi.org/10.15407/ukrbotj77.05.378>

Целюлази базидієвих грибів для розробки технологій біоконверсії клітковини

Сергій М. БОЙКО

ДУ "Інститут еволюційної екології НАН України"
вул. Академіка Лебедєва 37, Київ 03143, Україна
bsmbio@gmail.com

Boiko S.M. 2020. Cellulases of basidiomycetes for the development of cellulose bioconversion technologies. *Ukrainian Botanical Journal*, 77(5): 378–385.

Institute for Evolutionary Ecology, National Academy of Sciences of Ukraine
37 Acad. Lebedeva Str., Kyiv 03143, Ukraine

Abstract. Basidiomycetes cultures were screened for the ability to actively express the cellulases complex. Nutrient media with various forms of sugars were used. From 22 cultures of macromycetes (14 species), a group of six cultures with high level activities of extracellular (Il-11 *I. lacteus* – 70 IU, FvV *F. velutipes* – 78 IU, Pe-1 *P. eryngii* – 87 IU, Ps-1 *L. sulphureus* – 83 IU, Mg *M. giganteus* – 74 IU) and intracellular (Sc-51 *S. commune* – 102 IU) cellulase complex was selected. Cultures of the species exhibit notable differences in the expression of enzymes, which indicates a significant influence of genetic factors on the process of producer selection. Endo-1,4- β -D-glucanases isozymes for most fungi had a molecular weight of 55 kDa and above, except for *S. commune*, which had more variability of conformation and weight 12–55 kDa. The culture of Il-11 *I. lacteus* on media with Avicel and filter paper had the highest activity, its endo- and exo-1,4- β -D-glucanases activities ranged 37–39 IU/mL and 18–20 IU/mL, respectively. The culture of *S. commune* Sc-51 is able to accumulate a significant amount of intracellular cellulases, but the production of culture fluid with high viscosity complicates technological manipulations and increases processing time. The obtained data allowed us to isolate an Il-11 *I. lacteus* culture with stable expression and high activity of the cellulases complex at different carbon sources.

Keywords: Basidiomycota, cellulases, endo-1,4- β -D-glucanase, exo-1,4- β -D-glucanase, expression

Submitted 23 May 2020. Published 31 October 2020

Бойко С.М. 2020. Целюлази базидієвих грибів для розробки технологій біоконверсії клітковини. *Український ботанічний журнал*, 77(5): 378–385.

Реферат. Проведено скринінг культур базидієвих грибів на здатність до активної експресії целюлазного комплексу. Культивування відбувалось на поживних середовищах із вмістом цукрів різних форм. З 22 штамів макроміцетів (14 видів) було виділено групу з шести культур, що мали високі показники активності позаклітинного (*Irpex lacteus* Il-11 – 70 IU, *Flammulina velutipes* FvV – 78 IU, *Pleurotus eryngii* Pe-1 – 87 IU, *Laetiporus sulphureus* Ps-1 – 83 IU, *Meripilus giganteus* Mg – 74 IU) та внутрішньоклітинного (*Schizophyllum commune* Sc-51 – 102 IU) комплексу целюлаз. Встановлено, що культури одного виду мають значні відмінності у процесах експресії ензимів, що свідчить про суттєвий вплив генетичного фактору – це потрібно враховувати при доборі продуцента. Ізоферменти ендо-1,4- β -D-глюканази для більшості грибів мали молекулярну масу від 55 kDa і вище, окрім культур *S. commune*, для яких характерна більша варіабельність форм та маса 12–55 kDa. На середовищах із вмістом мікрокристалічної целюлози Avicel і фільтрувальним папером найбільшу активність мала культура *I. lacteus* Il-11, її ендо- та екзоглюканазна активності становили 37–39 IU/мл та 18–20 IU/мл відповідно. Культура *S. commune* Sc-51 здатна накопичувати значну кількість внутрішньоклітинних целюлаз, однак утворення культуральної рідини з високою в'язкістю суттєво ускладнює та збільшує тривалість технологічних маніпуляцій. Отримані дані дозволили виділити перспективний продуцент – культуру *I. lacteus* Il-11, що демонструє стабільну експресію та високу активність целюлазного комплексу за різних джерел вуглецю.

Ключові слова: Basidiomycota, експресія, ендо-1,4- β -D-глюканаза, екзо-1,4- β -D-глюканаза, целюлази

Вступ

Целюлоза – головний полімерний компонент рослинної стінки клітини, є найпоширенішим полісахаридом та важливим поновлюваним ресурсом. Її хімічний склад є простим, складається із залишків D-глюкози, пов'язаних β -1,4-глікозидними зв'язками. Перетворення лігноцелюлозної біомаси є багатоетапним процесом, що включає попередню обробку (механічну, хімічну або біологічну), ферментативний гідроліз, процес бродіння. На рис. 1 представлені шляхи отримання різних біотехнологічних продуктів з лігноцелюлозної біомаси.

Постійно зростаючі витрати на викопне паливо та парниковий ефект вимагають пошуку альтернативних дешевших та більш екологічно безпечних біопаливних ресурсів (Himmel et al., 2007; Gaurav et al., 2017). Один з потенційних методів виробництва біоетанолу полягає у використанні лігноцелюлозної біомаси, яку попередньо перетворюють на прості цукри (Sharma et al., 2018). Такий ферментативний гідроліз є ефективним та економічним методом і крім рН, температури, залежить від субстрату й активності ферментів (Wyman, 1999).

Існує ринковий попит на целюлази, адже витрати на цей клас ферментів суттєво впливають на виробництво етанолу (40–49% від чистої продукції) (Hahn-Hagerdal et al., 2006). На сьогодні комерційні целюлази виробляються переважно з

грибів *Aspergillus* sp. і *Trichoderma* sp. (*Ascomycota*) (Singhania et al., 2010).

Базидіоміцети здатні синтезувати ферменти, які каталізують розпад складних біополімерів – целюлозу, геміцелюлозу, лігнін, пектинові речовини (Floudas et al., 2012). Здатність до продукування целюлазних комплексів вищими базидіальними грибами у значній мірі пов'язана з генетичною (штамовою) різноманітністю, а експресія в основному індукується наявним субстратом (Xiao et al., 2013; Voiko, 2018). Інформація про властивості ферментних систем базидіальних грибів дає можливість розглядати останні як складову частину комплексного біотехнологічного процесу.

Метою дослідження було проведення скринінгу культур певних базидієвих грибів на здатність до активного синтезу целюлаз та визначення штамів з високим потенціалом експресії целюлазного комплексу.

Матеріали та методи

Об'єкти досліджень. Для первинного скринінгу використовували 22 культури базидієвих грибів 14 видів, які зберігаються в колекції культур грибів Інституту еволюційної екології НАН України (A-7 – *Auricularia auricula* Underw.; Cs-1 – *Coriolus sinuosus* Bondartsev & Singer; Fvv – *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer; Gl – *Ganoderma lucidum* (Curtis)

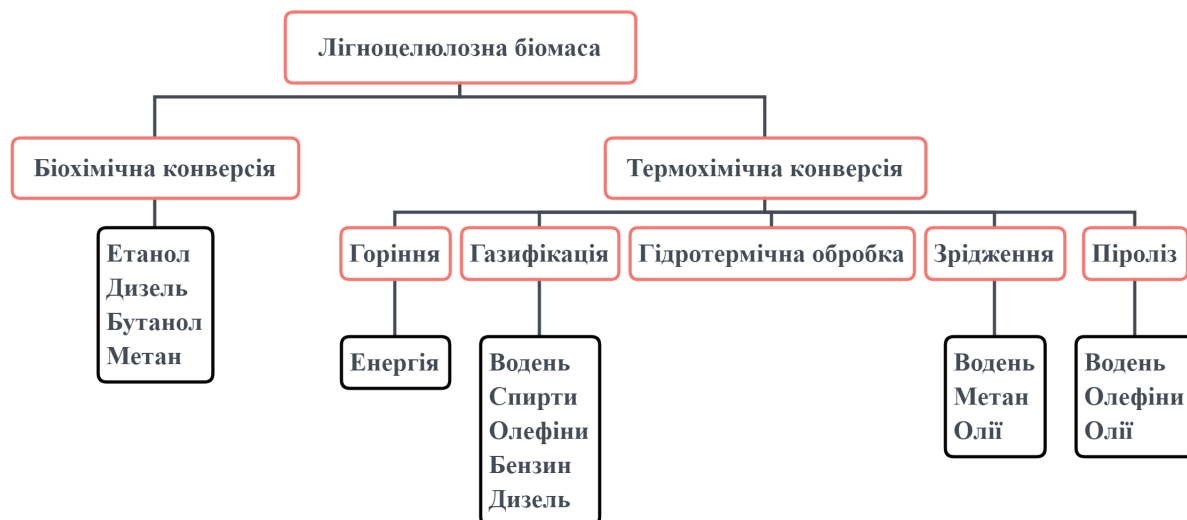


Рис. 1. Термомеханічна та біохімічна переробка лігноцелюлозної біомаси в різні біотехнологічні продукти

Fig. 1. Thermomechanical and biochemical processing of lignocellulosic biomass into various biotechnological products

P.Karst.; Il-11, Il-15, Il-20 – *Irpex lacteus* (Fr.) Fr.; Ps-1 – *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill; Mg – *Meripilus giganteus* P.Karst.; Pe-1 – *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél.; Po-3, Po-5, P191 – *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P.Kumm; Rs-1 – *Ramaria stricta* Quél.; Sc-51, Sc-51-5, Sc-89 – *Schizophyllum commune* Fr.; Sh1-4 – *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers.; Tk-1, Tv-13, Tvсв – *Trametes versicolor* (L.) Lloyd; Tb-33 – *Trichaptum biforme* (Fr.) Ryvarden).

Підготовка інокулята. Культури вирощували на агаризованому поживному середовищі такого складу (г/л): агар – 9, глюкоза – 5, крохмаль – 5, пептон – 3. Після 7 денного культивування отриманий міцелій використовували для інокуляції рідкого поживного середовища.

Культивування базидіоміцетів. Гриби культивували в стаціонарних умовах на рідких середовищах. Використовували поживні середовища такого складу (г/л):

1) модифіковане глюкозо-пептонне середовище (№ 1): K_2HPO_4 – 0,4; KH_2PO_4 – 0,6; $MgSO_4 \times H_2O$ – 0,5; $ZnSO_4 \times H_2O$ – 0,001; $CaCl_2$ – 0,05; пептон – 3, глюкоза – 3; Na-карбоксиметилцелюлоза – 3;

2) модифіковане середовище Чапека (№ 2): $NaNO_3$ – 2,0; K_2HPO_4 – 1,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,5; KCl – 0,5; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,01; фільтрувальний папір – 8,0.

Поживне середовище розливали по 25 мл у конічні колби об'ємом 100 мл, кислотність доводили до pH 5,0, температура культивування становила 28 °C.

Визначення вмісту білків. Концентрацію білків визначали спектрофотометричним методом на приладі Ulab-131UV з використанням формули: $C_{\text{мг/мл}} = 1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260}$, де A_{280} – оптична густина розчину при $\lambda = 280$ нм, A_{260} – оптична густина розчину при $\lambda = 260$ нм (Stoscheck, 1990).

Визначення активності целюлаз. Активність ферментів целюлозолітичного комплексу визначали по відношенню до таких субстратів: загальна целюлозолітична активність (FP) – фільтрувальний папір (Whatman № 1, щільність 80 г/м²), енд-1,4-β-D-глюканазна активність (endo-) – Na-карбоксиметилцелюлоза, екзо-1,4-β-D-глюканазна активність (exo-) – мікрокристалічна целюлоза Avicel PH-101 (Eveleigh et al., 2009). Склад реакційних сумішей при визначенні ферментативної активності та умови проведення реакцій відповідали рекомендаціям IUPAC (Ghose, 1987) та загальноприйнятим методикам (Eveleigh et al., 2009). За одиницю ферментативної активності (international units – IU) приймали утворення 1 мкмоль

редуючих цукрів (для полімерних субстратів) протягом 1 хв за температури 40 °C при додаванні 1 мл культурального фільтрату. Залишки редууючих вуглеводів визначали методом Сомоджи-Нельсона (Somogyi, 1952), питому ферментативну активність (specific international units – spIU) – відношенням загальної ферментативної активності до вмісту білків у культуральному фільтраті.

Електрофорез ферментних препаратів.

Електрофоретичне розділення ферментної суміші целюлаз здійснювали у 11,25%-му поліакриламідному гелі (ПААГ) з використанням *трис*-гліцинової буферної системи (pH 8,3). Для детекції енд-1,4-β-D-глюканаз після електрофорезу гель, що містив Na-КМЦ, витримували впродовж 30 хв у 0,1 М ацетатному буфері за температури 50 °C. Надалі його забарвлювали, використовуючи 0,1% розчин Конго червоний. Для встановлення молекулярної маси білків використовували набір PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas – Thermo Scientific). Гель-документування здійснювали за допомогою системи AlphaImager 2200 (Alpha Innotech).

Статистична обробка. Всі експерименти мали трикратну повторність. Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням дисперсійного аналізу та методу порівняння середніх.

Результати та обговорення

Дослідження росту базидіоміцетів за наявності в середовищі целюлози або простих цукрів не привели науковців до єдиної думки відносно індуктивного або конститутивного механізмів синтезу целюлаз. Речовини, що виконують функції індукторів, регулюють швидкість синтезу "індукованих" ферментів, а швидкість синтезу "конститутивних" ферментів не залежить від наявності індукторів у живильному середовищі. Вірогідним індуктором біосинтезу целюлаз у грибів може бути целобіоза – продукт розкладання нерозчинного субстрату, що містить β-1,4-глюкозидний зв'язок. Припускають, що у вищих базидіоміцетів постійно існує деяка "базова" активність целюлаз, яка забезпечує початковий гідроліз целюлози в середовищі з появою невеликої кількості розчинних продуктів. Унаслідок цього процесу утворюється необхідна початкова кількість целобіози (або інших низькомолекулярних сполук, що мають β-глікозидний зв'язок), достатня для початку індукованого біосинтезу. Зважаючи на це,

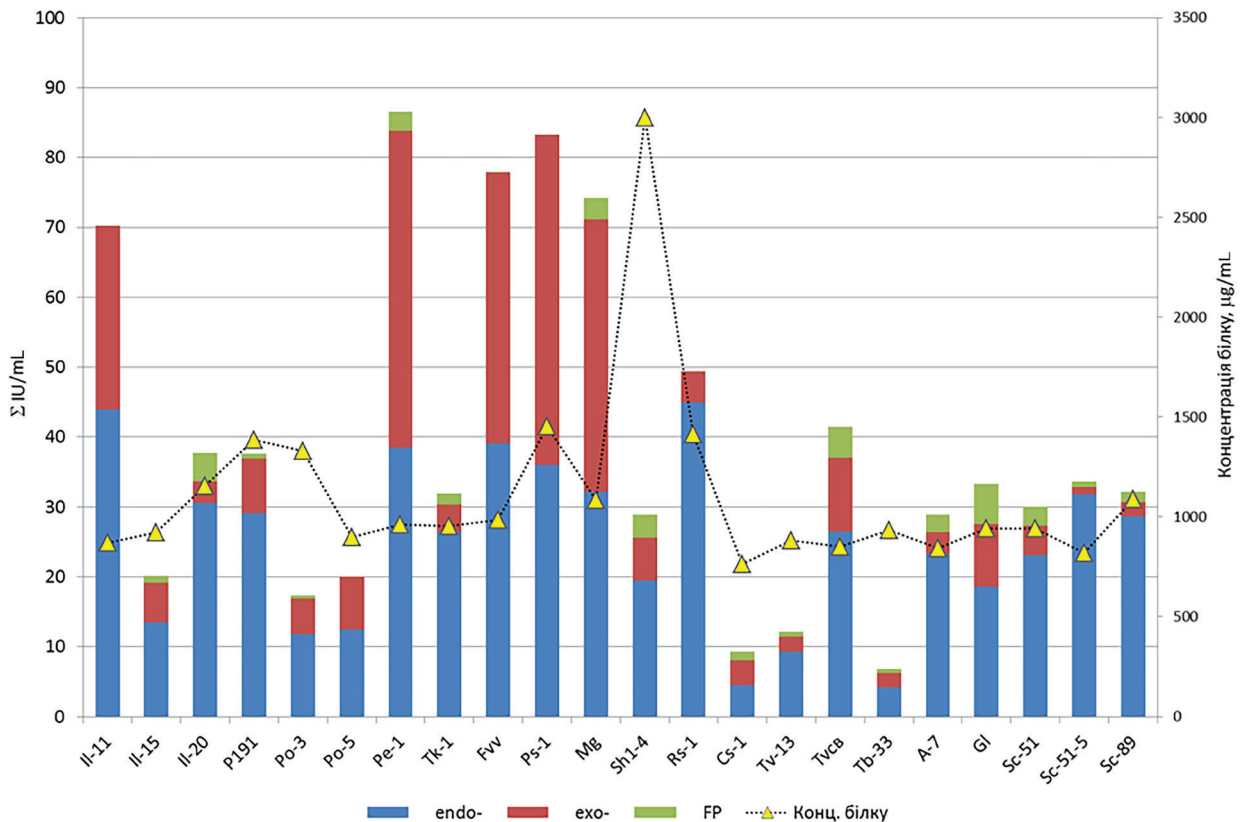


Рис. 2. Сумарна активність позаклітинних целюлаз культур базидієвих грибів. Тут і далі на рисунках позначено: "endo-": ендо-1,4-β-D-глюканазна активність; "exo-": екзо-1,4-β-D-глюканазна активність; "FP": загальна целюлозолітична активність

A-7 – *Auricularia auricula*; Cs-1 – *Coriolus sinuosus*; Fvv – *Flammulina velutipes*; G1 – *Ganoderma lucidum*; Il-11, Il-15, Il-20 – *Irpex lacteus*; Ps-1 – *Laetiporus sulphureus*; Mg – *Meripilus giganteus*; Pe-1 – *Pleurotus eryngii*; Po-3, Po-5, P191 – *Pleurotus ostreatus*; Rs-1 – *Ramaria stricta*; Sc-51, Sc-51-5, Sc-89 – *Schizophyllum commune*; Sh1-4 – *Stereum hirsutum*; Tk-1, Tv-13, Tvcv – *Trametes versicolor*; Tb-33 – *Trichaptum bifforme*

Fig. 2. A graph of extracellular cellulase activity of basidiomycetes ("endo-": endo-1,4-β-D-glucanase activity; "exo-": exo-1,4-β-D-glucanase activity; "FP": total cellulase activity)

до складу поживних середовищ було включено як прості цукри, так і полімерні форми (Ha et al., 2011).

Первинний скринінг культур на здатність до синтезу комплексу целюлаз проводили на середовищі № 1 протягом 10 діб. Усі сапротрофні гриби утворювали добре розвинений поверхневий і занурений міцелій та синтезували позаклітинні целюлази (рис. 2).

Серед дослідних культур було виділено групу із дуже високими сумарними показниками активності ферментів, а саме: *I. lacteus* (Il-11 – 70 IU), *F. velutipes* (Fvv – 78 IU), *P. eryngii* (Pe-1 – 87 IU), *M. giganteus* (Mg – 74 IU), *L. sulphureus* (Ps-1 – 83 IU). Висока активність кожного ензиму комплексу целюлаз дозволяє грибу швидше та ефективніше гідролізувати природні полімери та отримувати вуглеводи.

При цьому звертає на себе увагу помірний рівень концентрації білка в межах 900–1080 µg/mL (окрім Ps-1 *L. sulphureus* – 1450 µg/mL), що в цілому свідчить про високий рівень питомої целюлазної активності. Можна відзначити, що культури одного виду мають значні відмінності в процесах експресії ензимів, а це свідчить про суттєвий вплив генетичного фактора, тому необхідно це враховувати під час добору продуцента. Найвно це проілюстровано на рис. 3. Спостерігається візуальна різниця патернів у представників виду *I. lacteus* та *T. versicolor*. Для більшості дослідних грибів ізоферменти ендо-1,4-β-D-глюканази мають молекулярну масу від 55 kDa і вище, окрім представників *S. commune*,

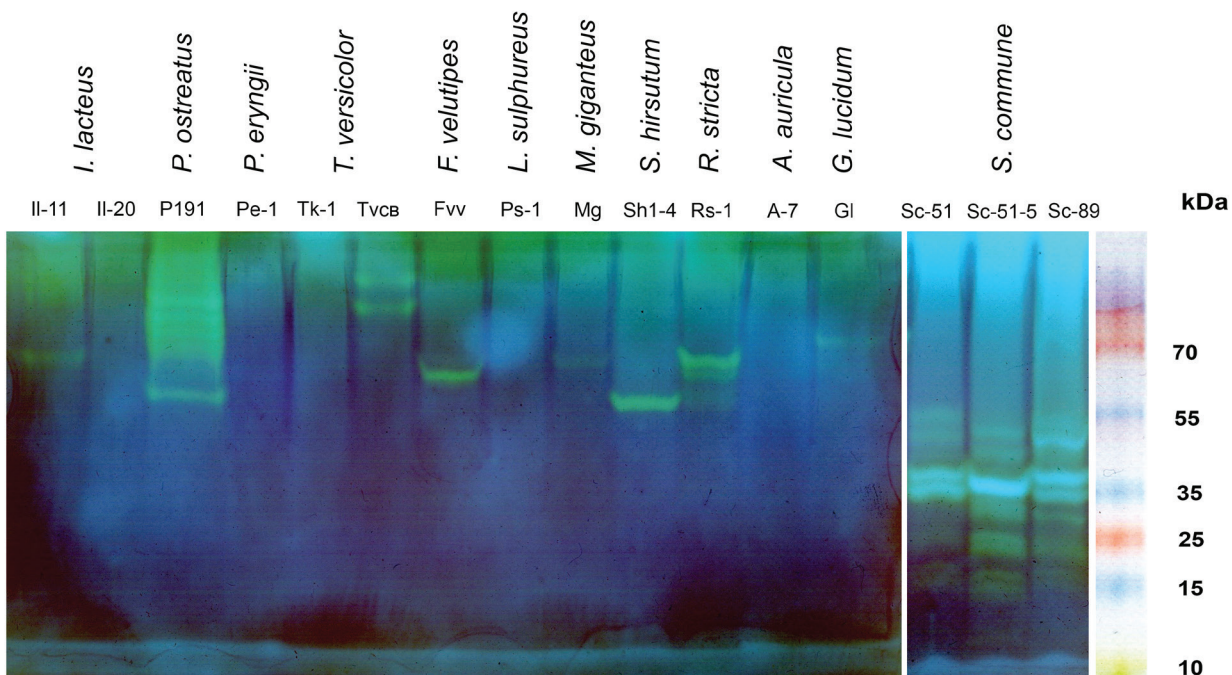


Рис. 3. Електрофореграма позаклітинних ендо-1,4-β-D-глюканаз культур базидіальних грибів
 Fig. 3. The electrophoregram of extracellular endo-1,4-β-D-glucanases of basidiomycetes

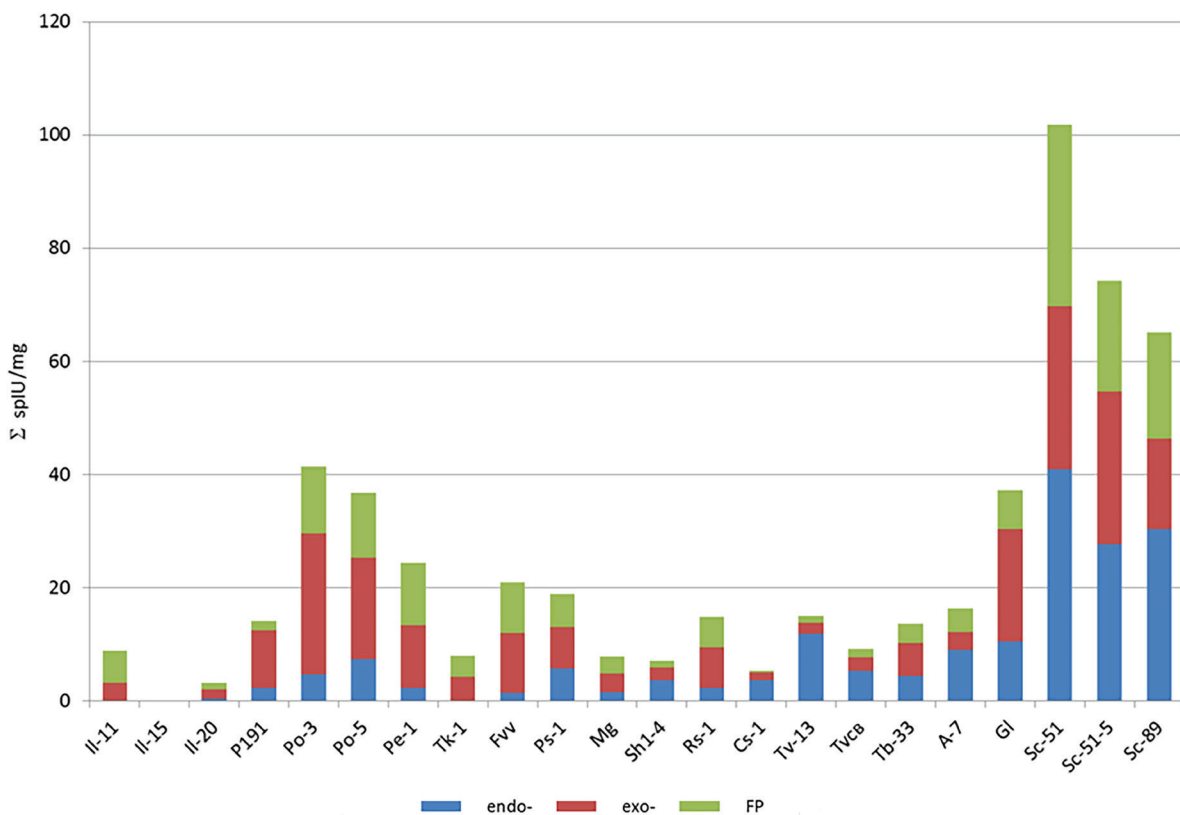


Рис. 4. Питома активність внутрішньоклітинних целюлаз культур базидіальних грибів
 Fig. 4. Specific activity of intracellular cellulases of basidiomycetes

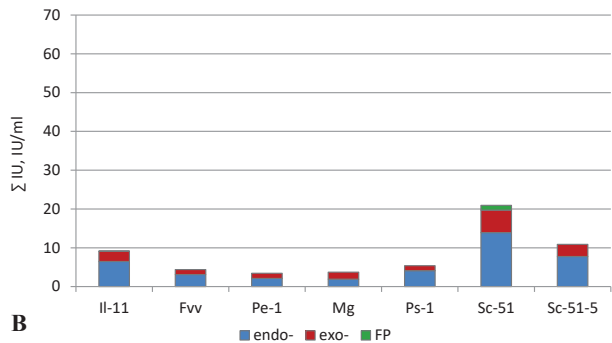
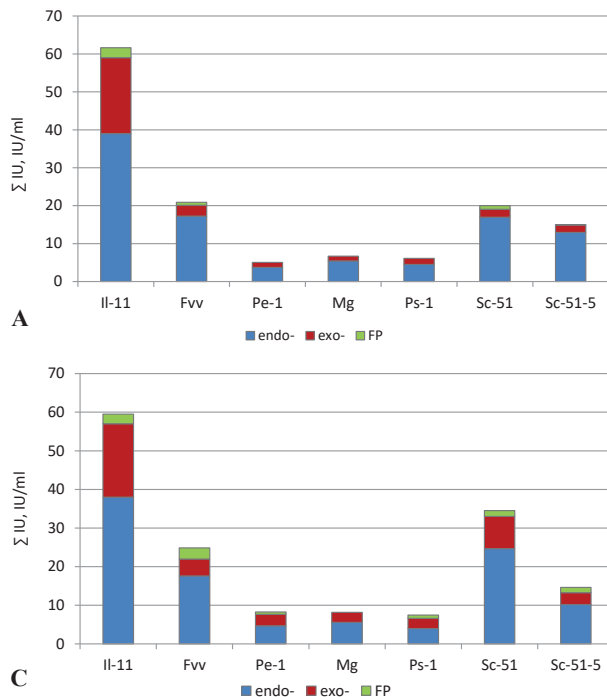


Рис. 5. Активність позаклітинних целюлаз базидієвих грибів за різних джерел вуглецю (А: мікрокристалічна целюлоза Avicel; В: висівки пшениці; С: фільтрувальний папір)

Fig. 5. The activity of extracellular cellulases of basidiomycetes at various carbon sources in the nutrient medium (A: Avicel; B: bran; C: filter paper)

які відрізняються варіабельністю ізоформ і масою 12–55 kDa.

Враховуючи можливу перспективу застосування культури у біотехнологічних процесах, було досліджено рівень накопичення внутрішньоклітинних целюлаз. Попередньо за низьких температур проводили гомогенізацію промитого міцелію та водне екстрагування білків із подальшим очищенням від залишків міцелію методом високошвидкісного центрифугування (3000 g). Отримані екстракти було перевірено на активність внутрішньоклітинних целюлаз (рис. 4). Встановлено, що загалом рівень їхньої активності поступався рівню позаклітинних (див. рис. 2). Однак для культур *P. ostreatus* Po-3, Po-5, *G. lucidum* G1 він був вищим, а для культур *S. commune* Sc-51 (102 IU/мг), Sc-51-5 (73 IU/мг), Sc-89 (64 IU/мг) – значно вищим за активності позаклітинних форм. Якщо у позаклітинних целюлаз у більшості превалювала активність ендо-1,4-β-D-глюканаз, то для внутрішньоклітинних целюлаз – активність екзо-1,4-β-D-глюканаз. Звертає увагу більш збалансована активність різних целюлаз у представників *S. commune* (рис. 4).

З досліджених нами 22 культур макроміцетів було виділено групу з шести культур з високими показниками позаклітинного (Il-11 – *I. lacteus*; Fvv –

F. velutipes; Pe-1 – *P. eryngii*; Ps-1 – *L. sulphureus*; Mg – *M. giganteus*) та внутрішньоклітинного (Sc-51 – *S. commune*) комплексу целюлаз. Надалі ці культури вирощували на середовищі № 2 з додаванням різних джерел вуглецю (мікрокристалічна целюлоза Avicel, висівки пшениці, фільтрувальний папір) з метою оцінки стабільності синтетичної діяльності (рис. 5).

За активністю целюлаз вирізнялася серед інших культура *I. lacteus* Il-11, її ендо- та екзоглюканазна активності становили 37–39 IU/мл і 18–20 IU/мл відповідно на середовищах з Avicel і фільтрувальним папером (рис. 5 A, C). Слід зазначити, що культура *I. lacteus* Il-11 порівняно з іншими дослідними культурами швидко деструктувала фільтрувальний папір, що свідчить про інтенсивну експресію целюлаз.

Невисока загалом активність целюлаз на середовищі з висівками зумовлена, на нашу думку, високим вмістом лігніну, який захищає клітковину від дії ферментів, і для руйнації якого необхідна активність додаткових ферментних систем (Jorgensen et al., 2007; Padhiar et al., 2010). Відповідно до роботи (Zhu et al., 2016), гриб *Schizophillum commune* має в своєму генетичному арсеналі подібні ферментні системи, що ми і спостерігаємо у вигляді найбільшої сумарної активності целюлаз (рис. 5, B).

Висновки

Таким чином, з шести культур базидіальних грибів можна виділити дві (II-11 *I. lacteus* та Sc-51 *S. commune*), які спроможні синтезувати комплекс целюлаз на високому рівні. Культура *S. commune* Sc-51 здатна накопичувати значну кількість внутрішньоклітинних целюлаз, що робить її привабливою для застосування в технологічних процесах, однак утворення культуральної рідини з високою в'язкістю суттєво ускладнює технологічні маніпуляції та збільшує тривалість їхнього проведення.

Виділені нами штами показують значення активності целюлаз, які не поступаються активностям комерційних культур *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, а іноді й перевищують їх (Juhasz et al., 2004; Kang et al., 2004). Подальша оптимізація режиму культивування надасть можливість значно збільшити рівень експресії целюлаз загалом.

Культура *I. lacteus* II-11 демонструє стабільну експресію та високу активність целюлазного комплексу за різних джерел вуглецю, що дає можливість розглядати її як перспективний продуцент.

Список посилань

Boiko S.M. 2018. Pool of endoglucanase genes in *Schizophyllum commune* Fr.:Fr. (*Basidiomycetes*) on the territory of Ukraine. *Acta Biologica Szegediensis*, 62(1): 53–59. <https://doi.org/10.14232/abs.2018.1.53-59>

Eveleigh D.E., Mandels M., Andreotti R., Roche C. 2009. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology for Biofuels*, 2: 21. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-21>

Floudas D., Binder M., Riley R., Barry K., Blanchette R.A., Henrissat B., Martinez A.T., Otilar R., Spatafora J.W., Yadav J.S., Aerts A., Benoit I., Boyd A., Carlson A., Copeland A., Coutinho P.M., de Vries R.P., Ferreira P., Findley K., Foster B., Gaskell J., Glotzer D., Gyrecki P., Heitman J., Hesse C., Hori C., Igarashi K., Jurgens J. A., Kallen N., Kersten P., Kohler A., Kües U., Kumar T.K.A., Kuo A., LaButti K., Larrondo L.F., Lindquist E., Ling A., Lombard V., Lucas S., Lundell T., Martin R., McLaughlin D.J., Morgenstern I., Morin E., Murat C., Nagy L.G., Nolan M., Ohm R.A., Patyshakuliyeva A., Rokas A., Ruiz-Duecas F.J., Sabat G., Salamov A., Samejima M., Schmutz J., Slot J.C., St. John F., Stenlid J., Sun H., Sun S., Syed K., Tsang A., Wiebenga A., Young D., Pisabarro A., Eastwood D.C., Martin F., Cullen D., Grigoriev I.V., Hibbett D.S. 2012. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31

fungal genomes. *Science*, 336(6089): 1715–1719. <https://doi.org/10.1126/science.1221748>

Gaurav N., Sivasankari S., Kiran G.S., Ninawe A., Selvin J. 2017. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 73: 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.070>

Ghose T.K. 1987. Measurement of cellulase activity. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2): 257–268.

Ha S.J., Galazka J.M., Kim S.R., Choi J.H., Yang X., Seo J.H., Glass N.L., Cate J.H.D., Jin Y.S. 2011. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2): 504–509. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010456108>

Hahn-Hagerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M.F., Liden G., Zacchi G. 2006. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24(12): 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.10.004>

Himmel M.E., Ding S.Y., Johnson D.K., Adney W.S., Nimlos M.R., Brady J.W., Foust T.D. 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315(5813): 804–807. <https://doi.org/10.1126/science.1137016>

Jorgensen H., Kristensen J.B., Felby C. 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1: 119–134. <https://doi.org/10.1002/bbb.4>

Juhasz T., Szengyel Z., Szijártó N., Réczey K. 2004. Effect of pH on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113-116(2): 201–211. <https://doi.org/10.1385/abab:113:1-3:201>

Kang S.W., Park Y.S., Lee J.S., Hong S.I., Kim S.W. 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 91(2): 153–156. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(03\)00172-x](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(03)00172-x)

Padhiar A., Albert S., Nagadesi P.K., Arya A. 2010. Lignin degradation by *Flavodon flavus* (Klotzsch.) Ryv. and *Schizophyllum commune* Fr. on *Mangifera indica* and *Syzygium cumini* woods. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 30(2): 129–139. <https://doi.org/10.1080/02773810903207770>

Sharma D., Sud A., Bansal S., Mahajan R., Sharma B.M., Chauhan R.S., Goel G. 2018. Endocellulase production by *Cotyledia pannosa* and its application in saccharification of wheat bran to bioethanol. *BioEnergy Research*, 11(2): 219–227. <https://doi.org/10.1007/s12155-017-9890-z>

Singhania R.R., Sukumaran R.K., Patel A.K., Larroche C., Pandey A. 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(7): 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>

Somogyi M. 1952. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 70(6): 17–23.

Stoscheck C.M. 1990. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*, 182: 50–69.

- Wyman C.E. 1999. Biomass ethanol: Technical progress, opportunities, and commercial challenges. *Annual Review of Energy and the Environment*, 24: 189–226. <https://doi.org/10.1146/annurev.energy.24.1.189>
- Xiao L.P., Shi Z.J., Bai Y.Y., Wang W., Zhang X.M., Sun R.C. 2013. Biodegradation of lignocellulose by white-rot fungi: structural characterization of water-soluble hemicelluloses. *BioEnergy Research*. 6: 1154–1164. <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9302-y>
- Zhu N., Liu J., Yang J., Lin Y., Yang Y., Ji L., Li M., Yuan H. 2016. Comparative analysis of the secretomes of *Schizophyllum commune* and other wood-decay basidiomycetes during solid-state fermentation reveals its unique lignocellulose-degrading enzyme system. *Biotechnology for Biofuels*, 9: 42. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0461-x>

Рекомендує до друку М.М. Сухомлин