

doi 10.18699/vjgb-25-141

Целлюлаза: основные свойства, природные источники и применение в промышленности

А.В. Задорожный, Н.М. Слынько , С.В. Банникова  , Н.В. Богачева, В.Н. Шляхтун, А.Р. Васильева , Е.Ю. Букатич, В.С. Ушаков, Ю.Е. Уварова, А.В. Коржук , А.А. Шипова , Д.В. Бочков, Е.Ю. Павлова, Д.О. Чесноков, С.Е. Пельтек  

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

 peltek@bionet.nsc.ru; sbann@bionet.nsc.ru

Аннотация. В последние годы целлюлаза привлекает огромное внимание как промышленно важный фермент с широким спектром применения. Целлюлазы представляют собой сложную группу ферментов, которые секретируются многообразием микроорганизмов, включая грибы и бактерии. Они относятся к подклассу ферментов гидролаз, субстратом которых является полисахарид целлюлоза. Целлюлазы имеют огромное практическое значение, поскольку содержащие целлюлозу материалы используются во множестве отраслей народного хозяйства. В этом обзоре приведены сведения об основных свойствах и структуре целлюлаз. Но основное внимание уделено применению этих ферментов в промышленности, а прочие аспекты, так или иначе, рассматриваются с учетом этого. Исследованы имеющие наибольшее практическое значение бактериальные и грибные целлюлазы, их основные преимущества и отличия. Отдельно рассмотрены экстремофильные (а именно термо-, психро- и галофильные) целлюлазы как обладающие свойствами, нужными в условиях современных технологических процессов. Поскольку для практического применения необходимы массовая продукция и оптимальное сочетание свойств ферментов, внимание также уделено получению эффективных продуцентов и модификации свойств, производимых целлюлаз. Наконец, обозначены ключевые тенденции в подходах к производству целлюлаз и перспективы практического применения.

Ключевые слова: целлюлаза; грибные и бактериальные целлюлазы; экстремофильные целлюлазы; структура и основные свойства целлюлаз; целлюлазный комплекс; биотехнология; генная инженерия

Для цитирования: Задорожный А.В., Слынько Н.М., Банникова С.В., Богачева Н.В., Шляхтун В.Н., Васильева А.Р., Букатич Е.Ю., Ушаков В.С., Уварова Ю.Е., Коржук А.В., Шипова А.А., Бочков Д.В., Павлова Е.Ю., Чесноков Д.О., Пельтек С.Е. Целлюлаза: основные свойства, природные источники и применение в промышленности. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(8):1348-1360. doi 10.18699/vjgb-25-141

Финансирование. Работа выполнена при поддержке проекта № FWNR-2025-0029 «Разработка технологий масштабирования производства кормовых ферментов, секретируемых *Komagataella phaffii*, и получения ферментных препаратов на их основе».

Cellulases: key properties, natural sources, and industrial applications

A.V. Zadorozhny, N.M. Slynko , S.V. Bannikova  , N.V. Bogacheva, V.N. Shlyakhtun, A.R. Vasilieva , E.Yu. Bukatich, V.S. Ushakov, Yu.E. Uvarova, A.V. Korzhuk , A.A. Shipova , D.V. Bochkov, E.Y. Pavlova, D.O. Chesnokov, S.E. Peltek  

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 peltek@bionet.nsc.ru; sbann@bionet.nsc.ru

Abstract. This review focuses on cellulases, a subclass of hydrolases that catalyse the breakdown of the polysaccharide cellulose. Cellulases are of immense practical significance, given that cellulose-containing materials are utilised across a multitude of industrial sectors. An overview of the fundamental properties and structure of cellulases is provided. However, primary attention is paid to the industrial application of these enzymes, with other aspects discussed within this context. The most practically significant bacterial and fungal cellulases are analysed, with their key benefits and differences being emphasised. Particular attention is paid to extremophilic (specifically thermo-, psychro-, and halophilic) cellulases, as they possess properties essential for modern technological processes. Given that practical application necessitates mass production and an optimal combination of enzymatic characteristics, the creation of effective producers and the modification of cellulase properties are also assessed. Finally, key trends in cellulase production approaches and their future application potential are summarised.

Key words: cellulase; fungal and bacterial cellulases; extremophilic cellulases; cellulase structure and essential properties; cellulase complex; biotechnology; genetic engineering

For citation: Zadorozhny A.V., Slynko N.M., Bannikova S.V., Bogacheva N.V., Shlyakhtun V.N., Vasilieva A.R., Bukatich E.Yu., Ushakov V.S., Uvarova Yu.E., Korzhuk A.V., Shipova A.A., Bochkov D.V., Pavlova E.Y., Chesnokov D.O., Peltek S.E. Cellulases: key properties, natural sources, and industrial applications. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1348-1360. doi 10.18699/vjgb-25-141

Введение

В связи с нарастающими экологическими проблемами и достижениями в области биотехнологий многие химические процессы в различных отраслях промышленности, таких как текстильная, кожевенная, целлюлозно-бумажная, переработка фруктов и овощей, пищевая, кормопроизводство, заменяются ферментативными биокатализаторами (Wackett, 2019). Ферменты могут быть выделены из различных источников: тканей животных, растений и клеток микробов. Микробные белки часто более стабильны, чем ферменты аналогичной специфичности, полученные из растительных или животных источников, и часто могут храниться в менее чем идеальных условиях в течение длительного времени без значительной потери биологической активности (Singhania et al., 2010). Большинство коммерческих ферментов получают из микроорганизмов, и такие свойства их, как термостабильность, стабильность в широких диапазонах pH и многофункциональность, делают эти ферменты потенциальными кандидатами для эффективных биотехнологических процессов в различных физико-химических условиях.

Целлюлазы являются вторым по представленности на рынке промышленным ферментом, и использование их продолжает нарастать с увеличением спроса со стороны целого ряда направлений: пищевой, целлюлозно-бумажной, текстильной, фармацевтической промышленности, производства моющих средств, комбикормов, биотоплива, переработки отходов (Ranjan et al., 2023).

Как и другие ферменты, целлюлазы получают из растений, микроорганизмов и животных. Однако при производстве этих ферментов чаще всего используются грибы и бактерии из-за таких свойств, как значительный выход продукции и снижение затрат. Исторически сложилось, что основными продуцентами целлюлаз были природные штаммы грибов, продуктивность которых была повышена методами селекции и/или мутагенеза. Однако, благодаря появлению и развитию технологии рекомбинантных ДНК, генной инженерии, белковой инженерии, направленной эволюции белков, методов «омикс-технологий» и высокопроизводительного секвенирования, были открыты новые микробы и их ферменты для промышленных приложений (Patel et al., 1994; Kirk et al., 2002; Rubin-Pitel, Zhao, 2006) и разработаны многочисленные рекомбинантные микробные целлюлазы. Эти ферменты представляют огромный интерес из-за их особых характеристик, таких как низкая стоимость, низкое энергопотребление каталитических процессов, экологическая безопасность, или нетоксичность, и высокая эффективность.

Во многих ситуациях желательное использование целлюлаз со свойствами, экстремальными в той или иной мере, – это стабильность и эффективность при высоких или низких значениях температуры, pH или давления, в присутствии органических растворителей или детергентов, при высокой ионной силе рабочих сред. Ферменты с такими свойствами регулярно обнаруживают при изучении микроорганизмов, обитающих в соответствующих условиях, хотя ферменты с необычными свойствами встречаются и у мезофильных организмов. В ответ на спрос выбор целлюлаз с самыми разнообразными свойствами постепенно растет. Подходы, основанные на ис-

пользовании ферментов, устойчивых к экстремальным условиям, позволят максимизировать эффект при сниженном расходе ферментов.

Целлюлазы: основные свойства и структура

Для производства широкого спектра целлюлаз активно используются как грибы, так и бактерии. Основное внимание на протяжении длительного времени было уделено грибам в силу их способности выделять наружу значительные количества ферментов. В последнее время эта тенденция смещается в сторону бактерий, что связано с их более высокими темпами роста, наличием ферментов с несколькими активностями и присутствием бактерий в самых разнообразных экологических нишах. Бактерии не только способны выжить в суровых условиях, но и часто вырабатывают стабильные ферменты, которые могут увеличить скорость катализируемого процесса по сравнению с грибными аналогами.

Субстратом для целлюлазы служит природный полимер целлюлоза. Целлюлазы – это ферментные системы, которые гидролизуют β -1,4-гликозидные связи в целлюлозном полимере. Целлюлаза способна гидролизовать гликозидные связи целлюлозы и производных целлюлозы в растворимые олигосахариды и глюкозу. Целлюлаза расщепляет β -1,4-гликозидные связи целлюлозы или ее производных, таких как целлоолигосахарид, до мономеров глюкозы (Nishida et al., 2007). Биохимическое превращение молекулы целлюлозы при биodeградации микроорганизмами катализируется внеклеточной ферментативной системой целлюлаз, включающей в себя три компонента (Bhat M.K., Bhat S., 1997): 1) β -1,4 глюкан глюканогидролаза (эндоглюканаза), которая расщепляет длинную целлюлозную цепь на более короткие фрагменты (EC 3.2.1.4); 2) β -1,4 глюкан целлобиогидролаза (экзоглюканаза), действующая с конца целлюлозной цепи, не обладающего восстановительной активностью (EC 3.2.1.91); 3) β -1,4 глюкозидаза разрушает глюкозидную связь целлобиозы и целлодекстринов, производя молекулы глюкозы, которые могут легко проникать в клетку (EC 3.2.1.21).

В природе для полного гидролиза полимера целлюлозы до единиц глюкозы необходимо синергичное действие всех трех ферментов (Uhlig, 1998). Целлюлазный комплекс имеет сложную пространственную структуру, позволяющую позиционировать волокно целлюлозы около активных центров ферментов. Существует два типа систем целлюлазы: один тип представлен внеклеточными целлюлазами мицелиальных грибов и аэробных бактерий, действующих синергически, чтобы разлагать целлюлозу, а другой тип – это фермент анаэробных клостридий, закрепленный на поверхности бактериальной клетки, так называемая, «целлюлосома».

Большинство целлюлаз имеет специфическую двухдоменную структуру: каталитический домен и целлюлозосвязывающий домен или углеводосвязывающий модуль, который обычно соединяется через пептидный линкер. Каталитический домен содержит каталитический сайт, в то время как целлюлозосвязывающий домен обеспечивает позиционирование целлюлозного волокна (Mathew et al., 2008).

Разлагающие целлюлозу аэробные грибы, например *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*), вырабатывают комплекс ферментов, действующий синергично и проявляющий все три основных активности – эндоглюканазную, экзоглюканазную и β -глюкозидазную (Dashtban et al., 2011; Mukherjee et al., 2012). Сначала эндоглюканазы расщепляют целлюлозные волокна в более аморфных участках, после чего экзоглюканазы получают возможность отщеплять молекулы целлобиозы от более кристаллизованных участков волокна, ранее не подверженных их действию. Наконец, β -глюкозидазы гидролизуют целлобиозу.

У большинства анаэробных микроорганизмов целлюлозолитическая система организована иначе: целый комплекс различных целлюлаз и гемицеллюлаз через посредство некаталитического белка скаффолдина организован в мультибелковый комплекс – целлюлосому, закрепленную на внешней стороне клетки. Молекулярный вес целлюлосом составляет до нескольких тысяч кДа (Pinheiro et al., 2009). На поверхности одной клетки *Clostridium thermocellum* (наиболее изученная бактерия-целлюлозолитик, способная очень быстро расти на целлюлозных субстратах) располагается несколько целлюлосом, чем обеспечивается надежная фиксация микроорганизма на волокне целлюлозы, а взаимное расположение различных ферментов в целлюлосоме облегчает им доступ к субстрату. Кроме того, кластридии вырабатывают также и свободные, не ассоциированные с целлюлосомами, целлюлазы. Неясно, действуют ли они с целлюлосомами синергично (Doi, Tamaru, 2001).

Благодаря такой системе организации целлюлозолитической системы простые сахара образуются в непосредственной близости к микроорганизму, что значительно облегчает ему доступ к питательным веществам. В ряде случаев анаэробные бактерии приобрели способность регулировать связывание целлюлосом на поверхности клетки, и в этих культурах можно обнаружить свободные целлюлосомы, а также изменять продукцию различных компонентов целлюлосомы в зависимости от условий роста (Mohand-Oussaid et al., 1999).

В состав целлюлосомы, помимо комплекса целлюлазных ферментов, входят углеводные фибриллы, которые могут составлять до 90 % молекулярной массы целлюлосомы. Они способствуют сорбции фермента на субстрате и скольжению фермента в фибриллярных структурах целлюлозы. Также углеводная часть целлюлаз защищает белок от действия денатурирующих агентов и протеаз.

Способность разных целлюлазных комплексов гидролизовать целлюлозу различается при высокой степени кристалличности субстрата. Многие комплексы теряют большую часть своей активности при возрастании степени кристалличности до 60–70 % и гидролизуют только аморфную часть субстрата. Способность таких комплексов к гидролизу целлюлозы с высокой степенью кристалличности зависит от наличия в них эндоглюканаз, которые могут прочно на ней сорбироваться, а скорость гидролиза кристаллической целлюлозы прямо зависит от количества сорбированной эндоглюканазы.

Промышленное применение целлюлаз

Целлюлазы весьма востребованы в целом ряде отраслей промышленности. Так, в пищевой промышленности целлюлаза традиционно используется для экстракции и осветления соков (Azman et al., 2021; Ozyilmaz, Gunay, 2023); она также активно применяется для улучшения диетических свойств бурого риса. Q. Zhang с коллегами (2019) в своей работе показали, что циклическая обработка целлюлазой и проращивание являются эффективным методом повышения уровня гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) в буром рисе и улучшения его кулинарных и вкусовых качеств.

Целлюлаза также используется для улучшения качества теста (Hu X. et al., 2022). Добавление картофеля к пшеничной муке повышает пищевую ценность хлеба, однако неблагоприятные эффекты, обусловленные высоким содержанием пищевых волокон в картофельной муке, могут повлиять на формирование глютеновой матрицы. Добавление целлюлазы и/или пектиназы способствует пышности и мягкости хлеба.

Перспективно применение целлюлазы для экстракции масел в пищевой и косметической промышленности. В статье D. Yu с коллегами (2022) приведен метод экстракции масла из рисовых отрубей с использованием магнитно-иммобилизованной целлюлазы в сочетании с магнитно-иммобилизованной щелочной протеазой. В работе M.O. Chiwetalu с коллегами (2022) представлен метод экстракции для получения жира из семян *Pycnanthus angolensis* посредством предварительной обработки ферментом штамма *Aspergillus niger* BC23.

В последнее время существенно продвинулась вперед технология биопереработки лигноцеллюлозы для производства биохимикатов и биотоплива с использованием фермента целлюлазы в качестве неотъемлемого компонента (Sharma et al., 2023).

A. Shankar с коллегами (2024) предварительно обрабатывали рисовую солому, рисовые отруби, пшеничную солому, древесную щепу, жом сорго и стебли хлопка базидиальным грибом *Ganoderma lucidum*. Гриб, благодаря своей лакказной активности, в значительной степени разрушает лигнин, присутствующий в биомассе. Сахарообразование предварительно обработанной биомассы консорциумами целлюлаз, выделенными из *Aspergillus flavus* MDU-5 и *Trichoderma citrinoviride* MDU-1, повышает выход сахаридов примерно на 70 % и этанола на 89 %. H. Sha с коллегами (2023) разработали новый подход к анаэробному сбраживанию кукурузной соломы с использованием магнитной целлюлазы, покрытой никелем и графитом. Разработанная система увеличила образование метана примерно на 74 % по сравнению с системой без покрытия. Эта система увеличивает общую популяцию электроактивных микробов *Bacteroidota* и *Methanomicrobiales*, а также коэффициент преобразования энергии до 57 %.

E. Zanusso с коллегами (2022) показали эффективность использования иммобилизованной на магнитных наночастицах целлюлазы для гидролиза биомассы кукурузных початков. Более того, магнитные свойства носителя делают этот метод перспективным для обеспечения не-

прерывной работы, что в конечном итоге способствует снижению стоимости процесса.

Целлюлаза используется в целлюлозно-бумажной промышленности в переработке макулатуры, предварительной обработке древесного сырья для удаления смолы (Chutani, Sharma, 2016; Lehr et al., 2021; Singh A. et al., 2021), что снижает воздействие целлюлозно-бумажной промышленности на окружающую среду.

В фармацевтической промышленности целлюлаза применяется для извлечения биологически активных соединений из растительного сырья (Puri et al., 2012; Cao et al., 2019; Hu Y. et al., 2021). Также целлюлаза широко используется в производстве таблетированных ферментных смесей для переваривания богатой клетчаткой растительной пищи. Например, VeganZyme, помимо улучшения пищеварения, также применяется в лечении нарушений обмена веществ (Ranjan et al., 2023). Целлюлаза и папаин используются для лечения фитобezoаров (Iwamuro et al., 2014).

Химическое разложение и сжигание являются наиболее распространенными методами очистки от загрязнений окружающей среды. Однако использование для очистки ферментов микроорганизмов проще и экологичнее (Okino-Delgado et al., 2019). *Bacillus cereus* и *B. subtilis* способны очищать отходы от сточных вод заводов по производству пальмового масла, поскольку обе бактерии вырабатывают целлюлазу и липазу для эффективной биodeградации отходов (Ranjan et al., 2023).

В исследовании J. Luo с коллегами (2021) целлюлаза использовалась при одновременной ферментации осадка сточных вод и бумажных отходов для получения летучих жирных кислот. Все эти исследования предполагают применение целлюлазы для очистки сточных вод и в производстве продукции с добавленной стоимостью.

Целлюлаза широко используется в производстве кормов для сельскохозяйственных животных. Целлюлаза и гемицеллюлаза способствуют гидролизу низкобелковых кормов и β -глюкана, тем самым повышая питательные свойства корма. Применение целлюлазы также приводит к снижению дуоденальной вязкости и улучшает пластичность корма, соответственно и улучшает переваривание и усвоение кормов животными (Azzaz et al., 2021; Selzer et al., 2021). В птицеводстве использование фермента целлюлазы является целесообразной стратегией, поскольку он способен разрушать целлюлозные связи, высвобождая питательные вещества, такие как глюкоза, увеличивая энергетическую ценность рациона и, таким образом, улучшая продуктивные показатели птиц (Perim et al., 2024).

В текстильной промышленности целлюлаза используется для повышения качества отделки изделий из ткани путем модификации выступающих волокон. Обработка целлюлазой уменьшает шероховатость ткани, увеличивает гладкость, глянец и цветоточность (Karmakar, Ray, 2011; Sajith et al., 2016).

Наряду с протеазами и липазами целлюлаза добавляется в моющие средства для повышения эффективности стирки. Она сохраняет форму и цвет выстиранной одежды, уменьшая образование пуха и катышков. Фермент также помогает в удалении грязи и пятен, избирательно воздействуя на целлюлозные волокна изнутри, разрушая свя-

зи между целлюлозой и частицами загрязнений, меняя структуру поверхности волокон и способствуя таким образом удалению грязи другими моющими ингредиентами. В настоящее время в моющие средства добавляют целлюлазы, как активные в широком диапазоне температур (30–60 °C), так и мезофильные (Kasana, Gulati, 2011). Целлюлазные ферменты используются в композициях моющих средств для обеспечения очищения, мягкости и сохранения окраски. Однако применение большинства целлюлаз было ограничено из-за негативного воздействия, которое они могут оказывать на прочность волокон ткани вследствие гидролиза кристаллической целлюлозы. В последнее время были разработаны целлюлазы с высокой специфичностью по отношению к аморфной целлюлозе для использования их чистящего потенциала без нежелательной потери прочности.

Грибные целлюлазы

Целлюлолитические грибы рода *Trichoderma* долго считались лучшим источником целлюлаз (Reese, Mandels, 1963). Основное узкое место целлюлаз *Trichoderma* – очень низкая активность β -глюкозидазы в супернатантах культуры и ингибирование этого фермента продуктом (Pérez et al., 2002). Целлюлаза, продуцируемая термофильными грибами *Sporotrichum thermophile* и *Talaromyces emersonii*, имеет активность, сравнимую с таковой мезофильного гриба *H. jecorina* (Coutts, Smith, 1976; Folan, Coughlan, 1978).

Humicola insolens является отличным производителем рН-нейтральных активных термостабильных целлюлаз, которые находят множество вариантов промышленного применения (Xu X. et al., 2016).

В исследовании (Chellapandi, Jani, 2008) изучена активность эндоглюканазы 26 штаммов *Streptomyces*, выделенных из садовой почвы. Два лучших, отобранных на основе потенциальной целлюлолитической активности на агаровой среде Беннетта, изолята были испытаны в различных условиях, включая источники углерода и азота, а также условия роста. Максимальная активность эндоглюканазы (11.25–11.90 Ед/мл) достигнута за 72–88 ч в ферментационной среде, содержащей детергент Tween-80, с последующим использованием фосфатных источников. Оба целлюлолитических изолята *Streptomyces* давали почти одинаковое количество фермента во всех испытаниях, однако влияние ингредиентов среды на индукцию эндоглюканазы в некоторой степени расходилось между штаммами. Подобно мезофильным грибам, термофильные грибы продуцируют все компоненты целлюлазного комплекса, синергически разрушая целлюлозу и гемицеллюлозу (Mathew et al., 2008).

Грибы являются продуцентами важных внеклеточных ферментов для промышленного использования. Особенно в этом смысле известны представители родов *Trichoderma*, *Penicillium* и *Aspergillus* (Zhao C.H. et al., 2018). Грибы весьма популярны для производства промышленных целлюлаз благодаря желательным свойствам, например внеклеточной секреции фермента в огромных количествах с экономически эффективными субстратами (Niyonzima, 2021). Для получения ферментов могут быть использованы субстраты на основе сельскохозяйственных отходов. Так, например, стебли кукурузы и багасса

сахарного тростника были использованы для получения детергентно-совместимых целлюлаз грибами *Aspergillus* (Imran et al., 2018; El-Baroty et al., 2019). В работе (Dave et al., 2012) задействовали легкодоступный дешевый жмых семян *Jatropha* для получения целлюлазы из *Thermoascus aurantiacus* RBB-1. В целом было обнаружено, что кристаллическая целлюлоза является лучшим источником углерода для производства целлюлазы в термофильных грибах, чем ее аморфные или смешанные формы (Fracheboud, Canevascini, 1989).

Гены грибных ферментов легко клонируются в бактериальные штаммы для производства целлюлаз, поскольку грибные ферменты менее сложны по структуре по сравнению с бактериальными (Maki et al., 2009; Acharya, Chaudhary, 2012). Однако основное преимущество их в том, что целлюлазы могут быть получены из грибов довольно простыми методами, а сами грибы способны вырабатывать целлюлазы при выращивании на дешевых субстратах. К тому же, поскольку они производят полный спектр целлюлаз, нитчатые грибы остаются наиболее популярными для промышленного производства целлюлаз (Ilić et al., 2023).

Бактериальные целлюлазы

Рядом исследователей обнаружено значительное преимущество бактериальных целлюлаз перед грибными в специфической активности и стабильности (Ejaz et al., 2021). Бактерии обладают высокой скоростью роста, адаптированы ко всем экологическим нишам, легко поддаются генетическим манипуляциям (Nyathi et al., 2023). Существует большое количество целлюлозолитических бактериальных штаммов, производящих специфические, устойчивые к экстремальным условиям ферменты (Bhati et al., 2021). Исследования бактериальных целлюлаз быстро развиваются и обнаруживают большее генетическое разнообразие, чем грибные, которые пока шире представлены на коммерческой основе (Ilić et al., 2023).

Наиболее распространенными целлюлолитическими бактериями являются *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacillus* spp., *Cellulomonas* spp., *Clostridium* spp., *Erwinia chrysanthemi*, *Thermobispora bispara*, *Ruminococcus albus*, *Streptomyces* spp., *Thermonospora* spp. и *Thermobifida* (Sadhu, Maiti, 2013). Тем не менее в настоящее время возрастает интерес к поиску новых штаммов целлюлозолитических бактерий. Как результат описано множество новых видов целлюлозолитических бактерий: *Streptomyces abietis* (Fujii et al., 2013), *Kallotenue papyrolyticum* (Cole et al., 2013), *Ornatilinea apprima* (Podosokorskaya et al., 2013), *Bacteroides luti* (Hatamoto et al., 2014), *Alicyclobacillus cellulossilyticus* (Kusube et al., 2014), *Anaerobaculum chartisolvens* (Horino et al., 2014), *Caldicellulosiruptor changbaiensis* (Bing et al., 2015), *Herbinix hemicellulosilytica* (Koeck et al., 2015), *Pseudomonas coleopterorum* (Menendez et al., 2015), *Siphonobacter aquaeclarae*, *Cellulosimicrobium funkei*, *Paracoccus sulfuroxidans*, *Ochrobactrum cytisi*, *O. haematophilum*, *Kaistia adipata*, *Devosia riboflavina*, *Labrys neptinae* и *Citrobacter freundii* (Huang et al., 2012), *Thermotoga naphthophila* (Akram, Haq, 2020), *Nocardiopsis dassonvillei* (Sivasankar et al., 2022).

Аэробные свободноживущие бактерии секретируют внеклеточные ферменты со связывающими модулями для различных конформаций целлюлозы. Синергизм действий ферментов обеспечивает эффективный гидролиз целлюлозосодержащего субстрата. Анаэробные бактерии, часто обитатели желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) питающихся растительной пищей животных, обладают таким внеклеточным мультиферментным комплексом, как целлюлосома. В целлюлосоме различные целлюлолитические ферменты выстраиваются на белке-скаффолде, что обеспечивает надежное прикрепление клеток к целлюлозе, высокую локальную концентрацию, а также правильное соотношение и порядок компонентов. Первой была изучена целлюлосома термофильной бактерии *C. thermocellum*, однако в настоящее время исследованы и целлюлосомы мезофильных клостридий, руминококков и других анаэробов (Schwarz, 2001).

Кроме целлюлосомных комплексов, у анаэробов, в частности у клостридий, представлены и секретируемые целлюлазы и гемицеллюлазы. А в ферментных системах *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Erwinia*, к примеру, не найдены целлюлогидролазы (их функция, видимо, не сводится к трофической, а заключается в облегчении проникновения фитопатогена в клетку хозяина) (Rabinovich et al., 2002).

Целлюлазы термофильных микроорганизмов

Целлюлазы обычно стабильны при относительно высоких температурах (Azadian et al., 2016). Ферменты термостабильных микроорганизмов имеют оптимум активности при температурах между 60 и 80 °C. В ферментативном гидролизе целлюлозы термостабильные целлюлазы обычно играют значительную роль, поскольку могут быть использованы непосредственно после этапа прогрева без предварительного охлаждения, что снижает длительность производственных циклов и повышает эффективность процесса (Liu D. et al., 2011).

Термофильные микроорганизмы продуцируют специализированные белки – шапероны, которые помогают вернуть белки в их естественную форму и восстановить их функции (Laksanalamai, Robb, 2004; Singh S.P. et al., 2010). У архей *Sulfolobus solfataricus* небольшой ДНК-связывающий белок Sso7d поддерживает стабильность агрегированных с ними белков (Ciaramella et al., 2002). Однако наличие подобных механизмов предполагает, что не обязательно ферменты термофильных организмов будут обладать собственной высокой термостабильностью, особенно вне организма-хозяина.

Белки термофильных бактерий, актиномицетов и архей переносят высокие температуры за счет повышенных электростатических, дисульфидных и гидрофобных взаимодействий в пространственной структуре (Ladenstein, Ren, 2006; Pedone et al., 2008). Некоторые термофильные ферменты стабилизируются ионами металлов и неорганических солей (Vieille, Zeikus, 2001). Целлюлолитическая активность некоторых термофильных грибов (*Chaetomium thermophile*, *Sporotrichum thermophile* и *T. aurantiacus*) в два-три раза больше, чем у *Trichoderma viridae* (Tansey, 1971).

Дополнительный фактор, который может влиять на термостабильность, – гликозилирование (Kahn et al., 2020;

Ramakrishnan et al., 2023). Это явление может приводить к повышению термостабильности фермента при клонировании бактериального гена в организм, способный к гликозилированию производимых белков, к примеру грибы.

Многие термофильные бактерии производят термостабильные целлюлозолитические ферменты, например, представители родов *Bacillus*, *Geobacillus*, *Caldibacillus*, *Acidothermus*, *Caldocellum* и *Clostridium* (Ghosh et al., 2020). Гипертермофильная бактерия *Dictyoglomus turgidum* несет ген (*Dtur_0671*), кодирующий β -глюкозидазу и экспрессированный в *Escherichia coli*. Этот фермент имеет максимальную активность при температуре 80 °C и pH 5.4, он чрезвычайно стабилен в диапазоне pH 5–8 и сохраняет 70 % своей активности через 2 ч при 70 °C. Показана его пригодность для промышленного производства биоэтанола, поскольку фермент проявил высокую устойчивость к глюкозе и этанолу (Fusco et al., 2018).

Ген целлюлозолитического фермента из *Thermotoga naphthophila* RKU-10T также был получен и экспрессирован в *E. coli*. Очищенный фермент TnCel12B показал максимальную активность при pH 6.0 и температуре 90 °C. Он сохранял 100 % активности после инкубации в течение 8 ч при 85 °C, а также в диапазоне pH 5.0–9.0 (Akram, Naq, 2020). Ген гипертермофильной археи *Sulfolobus shibatae*, кодирующий эндо-1,4- β -D-глюканазу, после клонирования и суперэкспрессии в *E. coli* продемонстрировал максимальную активность при 95–100 °C. Этот фермент показал отличную устойчивость к высоким температурам: сохранял полную активность после часовой инкубации при температурах до 85 °C; 98, 90 и 84 % исходной активности наблюдалось после 2 ч инкубации при 75, 80 и 85 °C соответственно (Boyce, Walsh, 2018).

Целлюлазы подразделяются на две группы в зависимости от их предпочтительных диапазонов pH: термоацидофильные целлюлазы (такие как целлюлазы видов *Alicyclobacillus*, *Geobacillus* и *T. aurantiacus*) процветают в кислых условиях, в то время как термоалкалофильные целлюлазы (видов *Bacillus*, *Halobacillus*) и археи предпочитают основные условия. Обе группы ферментов могут эффективно работать при высоких температурах, но их применение может варьировать в зависимости от конкретных потребностей различных отраслей промышленности (Arya et al., 2024).

Целлюлазы психрофильных микроорганизмов

Применение холодоактивных ферментов, работающих при щелочном pH, может, например, оказаться востребованным в моющих средствах, так как позволяет сохранить качество тканей без использования горячей воды. Для выделения ферментов, активных в диапазоне низких температур, используются психрофильные микроорганизмы. Психрофильные микроорганизмы составляют большую группу сапрофитных обитателей почвы, морей, пресных водоемов, сточных вод.

Метаболически активные бактерии, выживающие при температуре –5...–15 °C, были выделены из арктической вечной мерзлоты (Bakermans, Skidmore, 2011; Myktyczuk et al., 2013). Эти психрофилы могут выжить при низкой температуре, при этом внутриклеточные биохимические процессы осуществляются холодоактивными фермента-

ми. В дополнение к этому их внеклеточные ферменты также помогают разложить сложные материалы, присутствующие в окружающей среде. В мезофильных организмах влияние пониженных температур на активность ферментов более существенно, поскольку молекулы их ферментов имеют меньше структурных адаптаций к функционированию в таких условиях, что приводит к низкой активности фермента (Karan et al., 2012). Психрофилы, растущие в холодных условиях, обладают холодоустойчивыми ферментами с высокой каталитической активностью и стабильностью.

За последние полтора десятилетия были описаны психротрофные микроорганизмы, принадлежащие к различным группам. Первую низкотемпературную целлюлазу выделили в 1996 г. из гриба *Acremonium alcalophilum*. Эта целлюлаза имела максимальную активность при температуре 40 °C и pH 7.0, фермент сохранял более 20 % активности даже при 0 °C (Hayashi et al., 1996). Впоследствии целлюлазы были выделены и охарактеризованы и из других психрофильных микроорганизмов. Оптимальная температура для их активности обычно колеблется от 20 до 40 °C (см. таблицу), но иногда сообщается о более высоких температурах.

Адаптированные к холоду штаммы микроорганизмов были выделены в основном из антарктических и полярных регионов, которые представляют собой постоянно холодные среды. Другими потенциальными источниками холодоактивных целлюлаз являются грязевые и глубоко-водные осадочные микроорганизмы. Штамм *Clostridium*, выделенный из навозного биогаза, был способен расти при температурах от 5 до 50 °C, продуцируя спектр кислого- и целлюлолитических ферментов, наиболее активных при 20 °C (Akila, Chandra, 2003); целлюлаза, продуцируемая грибом *A. alcalophilum*, была активна даже при 0 °C (Hayashi et al., 1996).

Новая холодоустойчивая целлюлаза, принадлежащая к семейству GH5, названная CelE1, была извлечена из метагеномной библиотеки почвы с поля сахарного тростника. Для выделения целлюлолитических клонов был проведен функциональный скрининг этой библиотеки (Alvarez et al., 2013). Эндоглюканаза CelE1, выделенная таким способом, продемонстрировала высокую активность в широком диапазоне температур и в щелочных условиях.

В работе (Souza et al., 2015) исследовано влияние pH на вторичную и третичную структуры, заряд и активность CelE1. Хотя изменение pH оказывало небольшое влияние на структуру фермента, активность снижалась в кислых условиях. Оптимальная активность была достигнута при pH 8. Для того чтобы оценить пригодность CelE1 в качестве добавки в моющие и чистящие средства, активность CelE1 оценивали в присутствии поверхностно-активных веществ. T.V. Souza с коллегами не выявили значительного ингибирующего эффекта со стороны поверхностно-активных веществ на активность эндоглюканазы CelE1. Они также провели термодинамический анализ, основанный на структурной стабильности и химическом процессе разворачивания/рефолдинга CelE1. Результаты показали, что химическое разложение протекает как обратимый двухфазный процесс. Данные термодинамического анализа полезны для предсказания стабильности фермента.

Целлюлазы психрофильных микроорганизмов

Микроорганизм	Фермент	Оптимум температуры, °C	Оптимум pH	Активатор	Репрессор	Литературный источник
<i>Acremonium alcalophilum</i>	Целлюлаза	40	7.0	Глюкоза	–	Hayashi et al., 1996
<i>Arthrobacter</i> sp.	β-глюкозидаза	35	–	–	–	Benešová et al., 2005
<i>Clostridium</i> sp.	Эндоглюканаза, β-глюкозидаза	20	5–6	–	–	Akila, Chandra, 2003
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Эндоглюканаза	25	5.5	–	–	Iyo, Forsberg, 1999
<i>Paenibacillus</i> sp. strain C7	β-глюкозидаза	30–35	7–8	–	–	Shipkowski, Brenchley, 2005
<i>Paenibacillus</i> sp. BME-14	Эндоглюканаза	35	6.5	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , дитиотреитол, β-меркаптоэтанол	Cu ²⁺ , EDTA	Fu et al., 2010
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. DY3	Эндоглюканаза	40	6–7			Zeng et al., 2006
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Эндоглюканаза	50	4.5	Fe ³⁺ , Mn ²⁺	Al ³⁺ , Ca ²⁺ , Fe ²⁺ , EDTA, EGTA	Oikawa et al., 1998
<i>Shewanella</i> sp. G5	β-глюкозидаза	37	8	–	–	Cristóbal et al., 2008
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. MB-1	Эндоглюканаза	35	7.2	–	–	You, Wang, 2005

Психрофильная актинобактерия *Nocardiopsis dassonvillei* PSY13 производит высокоактивную холодоактивную целлюлазу с оптимумами 10 °C и pH 7.5 (Sivasankar et al., 2022). Компания “Novozymes” разработала холодоактивную целлюлазу (Celluzyme®), активную при 15 °C, из адаптированных к холоду грибов *H. insolens* и выпустила на рынок в составе смеси целлюлаз под торговым названием Celluclean®.

Целлюлазы галофильных микроорганизмов

Универсальное применение целлюлаз требует продолжения поиска новых источников ферментов. Ферменты морского происхождения в последнее время привлекают большое внимание, особенно для промышленного применения. Специализированные среды в морской экосистеме, включая эстуарии и мангровые заросли, богаты лигно-целлюлозной биомассой и, следовательно, обеспечивают питательную среду для перерабатывающих целлюлозу организмов. В этом контексте морские организмы являются перспективными кандидатами для многих промышленных процессов из-за их способности процветать в ограниченной питательными веществами окружающей среде и неблагоприятных условиях (Dalmaso et al., 2015; Barzkar, 2018). Благодаря высокой солености (3 %), в морской экосистеме эволюционировали более разнообразные целлюлолитические микроорганизмы, чем в наземной среде (Jahromi, Barzkar, 2018).

Исследования деградации целлюлозы в солевых условиях открыли новые метаболические пути и ферменты с целлюлолитической активностью. Разлагающие целлюлозу организмы, населяющие морские экосистемы, играют исключительную роль в минерализации органического вещества и тем самым повышают продуктивность этих экосистем (Milici et al., 2017). Способность к разложению целлюлозы обнаруживается у многих групп морских обитателей, включая бактерии (Harshvardhan et al., 2013),

дрожжи (Rong et al., 2015), плесневые грибы (Liu J. et al., 2012; Batista-García et al., 2017), протистов (Bremer, Talbot, 1995), коловраток (Chun et al., 1997), крыля (Tsuji et al., 2012) и иглокожих (Sakamoto et al., 2007).

Галотолерантная эндоглюканаза с молекулярной массой 39 кДа выделена из плесневого гриба *Botrytis ricini* URM 5627 (Silva et al., 2018). Оптимальные условия работы фермента – 50 °C и pH 5. Фермент был стабилен при температуре 39–60 °C в течение 60 мин и pH 4–6. Ферментативная активность увеличивалась в присутствии Na⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ и Zn²⁺ и уменьшалась в присутствии Ca²⁺, Cu²⁺ и Fe²⁺. Эндоглюканаза обнаружила галотолерантный профиль: ее активность возрастала пропорционально увеличению концентрации NaCl. Максимальная активность была достигнута при 2 М NaCl с увеличением активности на 75 %.

Выбор продуцентов, наиболее подходящих для наработки ферментов

E. coli и *Bacillus* sp. широко используются в качестве бактериальных систем для экспрессии рекомбинантных белков. Кроме того, в качестве платформ применяются и другие бактерии, в том числе *Z. mobilis* и *Streptomyces lividans*. *E. coli* представляет собой наиболее частую систему экспрессии целлюлаз в промышленности и имеет ряд преимуществ, таких как хорошо охарактеризованный геном, доступность в коммерческих формах и наборах, простота модификации. Однако имеются некоторые недостатки, которые необходимо учитывать, – ограниченная секреция (толстая внешняя мембрана, затрудненная транспортировка через мембрану), деградация линкерных последовательностей, снижение целлюлолитической активности, возможность образования телец включения. *Zymomonas mobilis* зарекомендовала себя как альтернатива использованию дрожжей из-за своей универсальности (она ферментирует широкий спектр сахаров), а

также в качестве альтернативы *E. coli*, так как способна экспрессировать рекомбинантные белки внутри- и внеклеточно.

Разработанные для *C. thermocellum* генетические методы отстают от таковых для модельных организмов, таких как *E. coli*. Работ по введению однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) не очень много. *C. thermocellum* – облигатная термофильная и анаэробная грамположительная бактерия, которая естественным образом ферментирует лигноцеллюлозу до этанола и органических кислот (Lynd et al., 2005; Olson et al., 2012; Xu Q. et al., 2016; Tian et al., 2019).

Существует две основные стратегии улучшения целлюлаз или компонентов целлюлазного комплекса путем генетических модификаций: 1) рациональный дизайн и 2) направленная эволюция (Acharya, Chaudhary, 2012). Преимущества и модификации (классический, случайный мутагенез или генетическая модификация) каждого из способов проверяются и используются различными специалистами для получения максимального выхода и эффективности целлюлазы. Для максимального выхода целлюлазы был выполнен (Sadhu et al., 2014) случайный мутагенез в целлюлолитическом штамме, принадлежащем к роду *Bacillus*, с использованием N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина (NTG), что приводит к переходным мутациям между нуклеотидами АТ и GC. Разработан мутантный штамм с повышенной активностью карбоксиметилцеллюлазы. Подобные результаты были получены на *Cellulomonas* sp. также с использованием NTG (Sangkharak et al., 2012), но характеристика этих мутантов до сих пор не опубликована.

Производство рекомбинантных ферментов включает разработку технологии, сочетающей в себе направленную эволюцию и рациональный дизайн (Zhao H. et al., 2002; Cherry, Fidantsef, 2003). Однако ограниченность знаний о субстратах целлюлаз, их взаимодействии с ферментами, взаимосвязях и регуляции активности целлюлазы все еще представляет серьезные помехи для рационального дизайна, что делает использование направленной эволюции более эффективным (Zhang Y.H.P. et al., 2006).

Тем не менее известны и примеры успешного применения метода рационального дизайна. Так, был проведен направленный мутагенез эндоглюканазы-II (Cel5A) из *H. jecorina* (Akbarzadeh et al., 2018). В структуре этого фермента имеется четыре дисульфидные связи, и он нестабилен при высоких температурах. Аминокислотные остатки цистеина в 99 и 323 положениях были заменены на валин и гистидин соответственно. В результате этого фермент утратил две дисульфидные связи и стал демонстрировать более высокую активность и термостабильность. Активность целлюлазы из *Gloeophyllum trabeum* (GtCel5) была повышена с помощью направленного мутагенеза петли 6 (Zheng et al., 2018). А.С. Dotsenko с коллегами (2020) продемонстрировали, что с помощью рационального дизайна можно повысить термостабильность целлюобиогидролазы путем замены пролина. Получившийся белок (G415P) имел в 3.5 раза большее время полужизни при 60 °C, чем белок дикого типа. Несколько исследователей рассмотрели и сравнили системы экспрессии рекомби-

нантных целлюлаз (Garvey et al., 2013; Hasunuma et al., 2013; Sadhu, Maiti, 2013; Juturu, Wu, 2014; Lambertz et al., 2014).

Некоторые исследователи сообщают о применении методов направленной эволюции в сочетании с рациональным дизайном сверхэкспрессии целлюлаз в их собственном бактериальном источнике. Такие виды, как *B. subtilis* и *C. thermocellum*, были использованы в качестве системы продуцирования гомологичных целлюлаз из-за простоты их генетической модификации и других характерных особенностей.

Однако использование этих бактерий имеет и свои недостатки, такие как низкий выход белка, высокие производственные затраты или необходимость наращивания культуры в обогащенной среде (Lambertz et al., 2014). В работе (Munjal et al., 2015) описано использование штамма *E. coli* для экспрессии β -1,4-эндоглюканазы и β -1,4-глюкозидазы из другого штамма *E. coli* под конститутивным промотором с возможностью ферментации гидролизатов биомассы.

D. Chung с коллегами (2014) сконструировали *Caldicellulosiruptor bescii*, бактерию, способную самостоятельно разлагать лигноцеллюлозную биомассу. Они клонировали и выполнили гомологичную экспрессию мультимодульной целлюлазы, называемой CelA, которая содержит домены GH9 и GH48.

Немалое количество работ также посвящено применению классического метода избыточного производства целевого белка или фермента путем клонирования его кодирующих генов в плазмиде с большим числом копий. Например, в статье (Robledo et al., 2011) описано применение этого метода для получения гомологичной сверхэкспрессии целлюлазы CelC2 из *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843, которая увеличивала его целлюлолитическую активность в 3 раза.

Х. Ху с коллегами (2016) разработали эффективную систему трансформации для *H. insolens*, опосредуемую *Agrobacterium tumefaciens*. Они трансформировали плазмиды, несущие промотор гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *H. insolens*, управляющего транскрипцией генов, кодирующих неомицинфосфотрансферазу, гидромицин В-фосфотрансферазу и усиленный зеленый флуоресцентный белок. Инсерционный мутагенез Т-ДНК был применен для создания мутантной библиотеки *H. insolens*. В результате был выделен трансформант под названием «Т4» с повышенной целлюлазной и гемицеллюлазной активностью. Активность фосфолипазы, эндоглюканазы, целлюобиогидролазы, β -глюкозидазы и ксиланазы Т4, измеренная в конце ферментации, составила 60, 440, 320, 41 % соответственно и была на 81 % выше, чем у штамма дикого типа.

Стратегии, основанные на гетерологичной экспрессии, сосредоточены на использовании нецеллюлолитических микроорганизмов, имеющих высокий коэффициент продукции для экспрессии микробных целлюлаз (Bhattacharya et al., 2015). Бактерии, такие как *E. coli*, различные виды родов *Bacillus*, *P. fluorescens*, *Ralstonia eutropha* и *Z. mobilis*; дрожжи, такие как *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*, и мицелиальные грибы из родов *Aspergil-*

lus и *Trichoderma* наиболее широко используются в исследованиях и в промышленности. Кроме того, для экспрессии белков используются культуры клеток млекопитающих, растений или насекомых, а также трансгенных растений и/или животных (Demain, Vaishnav, 2009).

Заключение

Промышленный спрос на ферменты целлюлазы в последние годы возрос благодаря их разнообразному применению в биокаталитических процессах расщепления целлюлозы. Широкая применимость и экологичность процессов, опосредованных целлюлазами, продолжают стимулировать исследования, направленные на поиск эффективных и экономически выгодных ферментов.

Традиционно для производства целлюлаз, как правило, используются культуры мицелиальных грибов. Однако большинство мицелиальных грибов, полученных путем естественной селекции, обладает низкой секреторной способностью к продукции целлюлазы, что не соответствует требованиям промышленного производства.

Эффективным методом увеличения продукции грибных ферментов является случайный мутагенез в сочетании со стратегией адаптивной лабораторной эволюции (Peng et al., 2021). Но в последние годы фокус внимания смещается в сторону бактериальных целлюлаз, поскольку эти ферменты отличаются большим разнообразием свойств, более высокой стабильностью, возможностью сочетания одновременно нескольких активностей в одном ферменте.

Экстремофильные микроорганизмы обладают разнообразием молекулярных стратегий выживания в экстремальных условиях. Их ферменты отличаются свойствами солеустойчивости, термостабильности, холодовой адаптивности. За последние годы были выделены термофильные, пьезофильные, ацидофильные и галофильные ферменты. Применение методов геной инженерии позволяет экспрессировать эти гены в других организмах, для которых уже существует богатый набор методов работы.

Значительное внимание привлекают технологии иммобилизации целлюлаз, в особенности использование комбинации полимерных носителей с наноматериалами. Такие иммобилизованные целлюлазы могут демонстрировать повышенные активность, стабильность, пригодность к повторному использованию и переработке. Сочетание наноматериалов и технологий биокатализа с применением иммобилизованных целлюлаз на сегодняшний день считается передовым полем исследований и разработки в ферментных технологиях (Ranjan et al., 2023).

Особенностью целлюлазы является ее комплексность. Для полноценной работы фермента необходимы все три составляющих комплекса (Bhat M.K., Bhat S., 1997). Такой комплекс сложен для клонирования в гетерологические системы, поэтому значительные усилия мирового сообщества сосредоточены на поиске природных продуцентов и разработке стратегий улучшения свойств путем генетической модификации выделенного организма. Клонирование же и экспрессию в стандартных продуцентах современной биотехнологии осуществляют для отдельных компонентов комплекса.

Список литературы / References

- Acharya S., Chaudhary A. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. *Braz J Microbiol.* 2012;43(3):844-856. doi 10.1590/S1517-83822012000300001
- Akbarzadeh A., Pourzardosht N., Dehnavi E., Ranaei Siadat S.O., Zamani M.R., Motallebi M., Nikzad Jamnani F., Aghaeepoor M., Barshan Tashnizi M. Disulfide bonds elimination of endoglucanase II from *Trichoderma reesei* by site-directed mutagenesis to improve enzyme activity and thermal stability: an experimental and theoretical approach. *Int J Biol Macromol.* 2018;120(Pt. B):1572-1580. doi 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.164
- Akila G., Chandra T.S. A novel cold-tolerant *Clostridium* strain PXYL1 isolated from a psychrophilic cattle manure digester that secretes thermolabile xylanase and cellulase. *FEMS Microbiol Lett.* 2003; 219(1):63-67. doi 10.1016/S0378-1097(02)01196-5
- Akram F., Haq I.U. Overexpression and characterization of TnCell2B, a hyperthermophilic GH12 endo-1,4- β -glucanase cloned from *Thermotoga naphthophila* RKU-10^T. *Anal Biochem.* 2020;599:113741. doi 10.1016/j.ab.2020.113741
- Alvarez T.M., Paiva J.H., Ruiz D.M., Cairo J.P., Pereira I.O., Paixão D.A., de Almeida R.F., Tonoli C.C., Ruller R., Santos C.R., Squina F.M., Murakami M.T. Structure and function of a novel cellulase 5 from sugarcane soil metagenome. *PLoS One.* 2013;8(12): e83635. doi 10.1371/journal.pone.0083635
- Arya M., Chauhan G., Fatima T., Verma D., Sharma M. Statistical modelling of thermostable cellulase production conditions of thermophilic *Geobacillus* sp. TP-1 isolated from Tapovan hot springs of the Garhwal Himalayan mountain ranges, India. *Indian J Microbiol.* 2024;64(3):1132-1143. doi 10.1007/s12088-024-01258-x
- Azadian F., Badoei-Dalfard A., Namaki-Shoushtari A., Hassanshahian M. Purification and biochemical properties of a thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus licheniformis* AMF-07 and its application for hydrolysis of different cellulosic substrates to bioethanol production. *Mol Biol Res Commun.* 2016;5(3):143-155. doi 10.22099/mbrc.2016.3743
- Azman N.A., Fuzi S.F.Z.M., Talip B.A., Abdullah S. Enzymatic clarification of soursop juice by pectinase/cellulase enzymes ratio. *Enhanced Knowledge Sci Technol.* 2021;1(2):234-243. doi 10.30880/ekst.2021.01.02.028
- Azzaz H.H., Abd A.M., Tawab E., Khattab M.S.A., Szumacher-Strabel M., Cieślak A.C., Murad H.A., Kielbowicz M., El-Sherbiny M. Effect of cellulase enzyme produced from *Penicilliumchrysogenum* on the milk production, composition, amino acid, and fatty acid profiles of egyptian buffaloes fed a high-forage diet. *Animals.* 2021; 11(11):3066. doi 10.3390/ANI11113066
- Bakermans C., Skidmore M.L. Microbial metabolism in ice and brine at -5°C . *Environ Microbiol.* 2011;13(8):2269-2278. doi 10.1111/j.1462-2920.2011.02485.x
- Barzkar N., Homaei A., Hemmati R., Patel S. Thermostable marine microbial proteases for industrial applications: scopes and risks. *Extremophiles.* 2018;22(3):335-346. doi 10.1007/s00792-018-1009-8
- Batista-García R.A., Sutton T., Jackson S.A., Tovar-Herrera O.E., Balcázar-López E., Sánchez-Carbente M.D., Sánchez-Reyes A., Dobson A.D., Folch-Mallol J.L. Characterization of lignocellulolytic activities from fungi isolated from the deep-sea sponge *Stelletta normani*. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173750. doi 10.1371/journal.pone.0173750
- Benešová E., Marková M., Králová B. α -Glucosidase and β -glucosidase from psychrotrophic strain *arthrobacter* sp. C2-2. *Czech J Food Sci.* 2005;23(3):116-120. doi 10.17221/3380-CJFS
- Bhat M.K., Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol Adv.* 1997;15(3-4):583-620. doi 10.1016/s0734-9750(97)00006-2
- Bhati N., Shreya, Sharma A.K. Cost-effective cellulase production, improvement strategies, and future challenges. *J Food Process Eng.* 2021;44(2):e13623. doi 10.1111/jfpe.13623
- Bhattacharya A.S., Bhattacharya A., Pletschke B.I. Synergism of fungal and bacterial cellulases and hemicellulases: a novel perspective

- for enhanced bio-ethanol production. *Biotechnol Lett.* 2015;37(6): 1117-1129. doi 10.1007/s10529-015-1779-3
- Bing W., Wang H., Zheng B., Zhang F., Zhu G., Feng Y., Zhang Z. *Caldicellulosiruptor changbaiensis* sp. nov., a cellulolytic and hydrogen-producing bacterium from a hot spring. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015;65(Pt. 1):293-297. doi 10.1099/ijs.0.065441-0
- Boyce A., Walsh G. Expression and characterisation of a thermophilic endo-1,4- β -glucanase from *Sulfolobus shibatae* of potential industrial application. *Mol Biol Rep.* 2018;45(6):2201-2211. doi 10.1007/s11033-018-4381-7
- Bremer G.B., Talbot G. Cellulolytic enzyme activity in the marine protist *Schizochytrium aggregatum*. *Bot Mar.* 1995;38(1-6):37-42. doi 10.1515/botm.1995.38.1-6.37
- Cao L., Yu M., Wang C., Bao Y., Zhang M., He P., Zhang Y., Yang T., Li L., Li G., Gong Y. Cellulase-assisted extraction, characterization, and bioactivity against rheumatoid arthritis of *Astragalus* polysaccharides. *Int J Polym Sci.* 2019;2:8514247. doi 10.1155/2019/8514247
- Chellapandi P., Jani H.M. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. *Braz J Microbiol.* 2008;39(1):122-127. doi 10.1590/S1517-838220080001000026
- Cherry J.R., Fidantsef A.L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14(4):438-443. doi 10.1016/s0958-1669(03)00099-5
- Chiwetalu M.O., Ossai E.C., Enechi O.C., Ugwu C.N., Ozogwu V.E., Okpala C.O.R., Njoku O.U. An enhanced fat extraction from *Pycnanthus angolensis* (African nutmeg) seeds using cellulase from *Aspergillus niger* strain BC23. *Qual Assur Saf Crops Foods.* 2022; 14(3):165-175. doi 10.15586/qas.v14i3.997
- Chun C.Z., Hur S.B., Kim Y.T. Purification and characterization of an endoglucanase from the marine rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Biochem Mol Biol Int.* 1997;43(2):241-249. doi 10.1080/15216549700204021
- Chung D., Cha M., Guss A.M., Westpheling J. Direct conversion of plant biomass to ethanol by engineered *Caldicellulosiruptor bescii*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(24):8931-8936. doi 10.1073/pnas.1402210111
- Chutani P., Sharma K.K. Concomitant production of xylanases and cellulases from *Trichoderma longibrachiatum* MDU-6 selected for the deinking of paper waste. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2016;39(5): 747-758. doi 10.1007/s00449-016-1555-3
- Ciaramella M., Pisani F.M., Rossi M. Molecular biology of extremophiles: recent progress on the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2002;81(1-4):85-97. doi 10.1023/a:1020577510469
- Cole J.K., Gieler B.A., Heisler D.L., Palisoc M.M., Williams A.J., Dohnalkova A.C., Ming H., Yu T.T., Dodsworth J.A., Li W.-J., Hedlund B.P. *Kallotenue papyrolyticum* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic and filamentous thermophile that represents a novel lineage (*Kallotenuales* ord. nov., *Kallotenuaceae* fam. nov.) within the class *Chloroflexia*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63(12):4675-4682. doi 10.1099/ijs.0.053348-0
- Coutts A.D., Smith R.E. Factors influencing the production of cellulases by *Sporotrichum thermophile*. *Appl Environ Microbiol.* 1976; 31(6):819-825. doi 10.1128/aem.31.6.819-825.1976
- Cristóbal H.A., Breccia J.D., Abate C.M. Isolation and molecular characterization of *Shewanella* sp. G5, a producer of cold-active beta-D-glucosidases. *J Basic Microbiol.* 2008;48(1):16-24. doi 10.1002/jobm.200700146
- Dalmaso G.Z., Ferreira D., Vermelho A.B. Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *Mar Drugs.* 2015;13(4):1925-1965. doi 10.3390/md13041925
- Dashtban M., Buchkowski R., Qin W. Effect of different carbon sources on cellulase production by *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) strains. *Int J Biochem Mol Biol.* 2011;2(3):274-286
- Dave B.R., Sudhir A.P., Pansuriya M., Raykundaliya D.P., Subramanian R.B. Utilization of *Jatropha* deoiled seed cake for production of cellulases under solid-state fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2012;35(8):1343-1353. doi 10.1007/s00449-012-0723-3
- Demain A.L., Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv.* 2009;27(3):297-306. doi 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008
- Doi R.H., Tamaru Y. The *Clostridium cellulovorans* cellulosome: an enzyme complex with plant cell wall degrading activity. *Chem Rec.* 2001;1(1):24-32. doi 10.1002/1528-0691(2001)1:1<24::AID-TCRS>3.0.CO;2-W
- Dotsenko A.S., Dotsenko G.S., Rozhkova A.M., Zorov I.N., Sinityn A.P. Rational design and structure insights for thermostability improvement of *Penicillium verrucosum* Cel7A cellobiohydrolase. *Biochimie.* 2020;176:103-109. doi 10.1016/j.biochi.2020.06.007
- Ejaz U., Sohail M., Ghanemi A. Cellulases: from bioactivity to a variety of industrial applications. *Biomimetics.* 2021;6(3):44. doi 10.3390/biomimetics6030044
- El-Baroty G., Abou Elella F., Moawad H., El Sebai T., Abdulaziz F., Khattab A.A. Optimization and characterization of extracellular cellulase produced by native Egyptian fungal strain. *Notulae Botanicae.* 2019;47(3):743-750. doi 10.15835/nbha47311500
- Folan M.A., Coughlan M.P. The cellulase complex in the culture filtrate of the thermophilic fungus, *Talaromyces emersonii*. *Int J Biochem.* 1978;9(10):717-722. doi 10.1016/0020-711x(78)90038-1
- Fracheboud D., Canevascini G. Isolation, purification, and properties of the exocellulase from *Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile*. *Enzyme Microb Technol.* 1989;11(4):220-229. doi 10.1016/0141-0229(89)90096-3
- Fu X., Liu P., Lin L., Hong Y., Huang X., Meng X., Liu Z. A novel endoglucanase (Cel9P) from a marine bacterium *Paenibacillus* sp. BME-14. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010;160(6):1627-1636. doi 10.1007/s12010-009-8648-2
- Fujii K., Satomi M., Fukui Y., Matsunobu S., Morifuku Y., Enokida Y. *Streptomyces abietis* sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from soil of a pine forest. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63(Pt. 12): 4754-4759. doi 10.1099/ijs.0.053025-0
- Fusco F.A., Ronca R., Fiorentino G., Pedone E., Contursi P., Bartolucci S., Limauro D. Biochemical characterization of a thermostable endomannanase/endoglucanase from *Dictyoglomus turgidum*. *Extremophiles.* 2018;22(1):131-140. doi 10.1007/s00792-017-0983-6
- Garvey M., Klose H., Fischer R., Lambertz C., Commandeur U. Cellulases for biomass degradation: comparing recombinant cellulase expression platforms. *Trends Biotechnol.* 2013;31(10):581-593. doi 10.1016/j.tibtech.2013.06.006
- Ghosh S., Lepcha K., Basak A., Mahanty A.K. Thermophiles and thermophilic hydrolases. In: Salwan R., Sharma V. (Eds) *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*. Academic Press, 2020;219-236. doi 10.1016/B978-0-12-818322-9.00016-2
- Harshvardhan K., Mishra A., Jha B. Purification and characterization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: a potential agent for single step saccharification of seaweed biomass. *J Mol Catal B Enzym.* 2013;93:51-56. doi 10.1016/j.molcatb.2013.04.009
- Hasunuma T., Okazaki F., Okai N., Hara K.Y., Ishii J., Kondo A. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresour Technol.* 2013;135:513-522. doi 10.1016/j.biortech.2012.10.047
- Hatamoto M., Kaneshige M., Nakamura A., Yamaguchi T. *Bacteroides luti* sp. nov., an anaerobic, cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from methanogenic sludge. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;64(Pt. 5): 1770-1774. doi 10.1099/ijs.0.056630-0
- Hayashi K., Nimura Y., Ohara N., Uchimura T., Suzuki H., Komacata K., Kozaki M. Low-temperature-active cellulase produced by *Acremonium alcalophilum*-JCM 7366. *J Ferment Bioeng.* 1996; 74(1):7-10
- Horino H., Fujita T., Tonouchi A. Description of *Anaerobacterium chartisolvans* gen. nov., sp. nov., an obligately anaerobic bacterium from *Clostridium* rRNA cluster III isolated from soil of a Japanese rice field, and reclassification of *Bacteroides cellulosolvans*

- Murray et al. 1984 as *Pseudobacteroides cellulossolvens* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64(Pt. 4):1296-1303. doi 10.1099/ijs.0.059378-0
- Hu X., Cheng L., Hong Y., Li Z., Li C., Gu Z. Impact of celluloses and pectins restrictions on gluten development and water distribution in potato-wheat flour dough. *Int J Biol Macromol*. 2022;206:534-542. doi 10.1016/j.ijbiomac.2022.02.150
- Hu Y., Kang G., Wang L., Gao M., Wang P., Yang D., Huang H. Current status of mining, modification, and application of cellulases in bioactive substance extraction. *Curr Issues Mol*. 2021;43(2):687-703. doi 10.3390/cimb43020050
- Huang S., Sheng P., Zhang H. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Int J Mol Sci*. 2012;13(3):2563-2577. doi 10.3390/ijms13032563
- Ilić N., Milić M., Beluhan S., Dimitrijević-Branković S. Cellulases: from lignocellulosic biomass to improved production. *Energies*. 2023;16(8):3598. doi 10.3390/en16083598
- Imran M., Anwar Z., Zafar M., Ali A., Arif M. Production and characterization of commercial cellulase produced through *Aspergillus niger* IMMS1 after screening fungal species. *Pak J Bot*. 2018; 50(4):1563-1570
- Iwamuro M., Kawai Y., Shiraha H., Takaki A., Okada H., Yamamoto K. In vitro analysis of gastric phytobezoar dissolubility by Coca-Cola, Coca-Cola Zero, cellulase, and papain. *J Clin Gastroenterol*. 2014;48(2):190-191. doi 10.1097/MCG.0b013e3182a39116
- Iyo A.H., Forsberg C.W. A cold-active glucanase from the ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(3):995-998. doi 10.1128/aem.65.3.995-998.1999
- Jahromi S.T., Barzkar N. Future direction in marine bacterial agarases for industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018; 102(16):6847-6863. doi 10.1007/s00253-018-9156-5
- Juturu V., Wu J.C. Microbial cellulases: engineering, production and applications. *Renew Sustain Energy Rev*. 2014;33:188-203. doi 10.1016/j.rser.2014.01.077
- Kahn A., Moraïs S., Chung D., Sarai N.S., Hengge N.N., Kahn A., Himmel M.E., Bayer E.A., Bomble Y.J. Glycosylation of hyperthermostable designer cellulosome components yields enhanced stability and cellulose hydrolysis. *FEBS J*. 2020;287(20):4370-4388. doi 10.1111/febs.15251
- Karan R., Capes M.D., Dassarma S. Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Aquat Biosyst*. 2012; 8(1):4. doi 10.1186/2046-9063-8-4
- Karmakar M., Ray R.R. Current trends in research and application of microbial cellulases. *Res J Microbiol*. 2011;6(1):41-53. doi 10.3923/jm.2011.41.53
- Kasana R.C., Gulati A. Cellulases from psychrophilic microorganisms: a review. *J Basic Microbiol*. 2011;51(6):572-579. doi 10.1002/jobm.201000385
- Kirk O., Borchert T.V., Fuglsang C.C. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2002;13(4):345-351. doi 10.1016/s0958-1669(02)00328-2
- Koeck D.E., Ludwig W., Wanner G., Zverlov V.V., Liebl W., Schwarz W.H. *Herbinix hemicellulosilytica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic cellulose-degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015;65(8):2365-2371. doi 10.1099/ijs.0.000264
- Kusube M., Sugihara A., Moriwaki Y., Ueoka T., Shimane Y., Minegishi H. *Alicyclobacillus cellulossilyticus* sp. nov., a thermophilic, cellulolytic bacterium isolated from steamed Japanese cedar chips from a lumbermill. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64(7):2257-2263. doi 10.1099/ijs.0.061440-0
- Ladenstein R., Ren B. Protein disulfides and protein disulfide oxidoreductases in hyperthermophiles. *FEBS J*. 2006;273(18):4170-4185. doi 10.1111/j.1742-4658.2006.05421.x
- Laksanalamai P., Robb F.T. Small heat shock proteins from extremophiles: a review. *Extremophiles*. 2004;8(1):1-11. doi 10.1007/s00792-003-0362-3
- Lambertz C., Garvey M., Klinger J., Heesel D., Klose H., Fischer R., Commandeur U. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. *Biotechnol Biofuels*. 2014;7(1):135. doi 10.1016/j.rser.2014.01.077
- Lehr M., Miltner M., Friedl A. Removal of wood extractives as pulp (pre-)treatment: a technological review. *SN Appl Sci*. 2021;3:886. doi 10.1007/s42452-021-04873-1
- Liu D., Zhang R., Yang X., Xu Y., Tang Z., Tian W., Shen Q. Expression, purification and characterization of two thermostable endoglucanases cloned from a lignocellulosic decomposing fungi *Aspergillus fumigatus* Z5 isolated from compost. *Protein Expr Purif*. 2011; 79(2):176-186. doi 10.1016/j.pep.2011.06.008
- Liu J., Xue D., He K., Yao S. Cellulase production in solid-state fermentation by marine *Aspergillus* sp. ZJUBE-1 and its enzymological properties. *Adv Sci Lett*. 2012;16(1):381-386. doi 10.1166/asl.2012.3304
- Luo J., Li Y., Li Y., Li H., Fang X., Li Y., Huang W., Cao J., Wu Y. Waste-to-energy: cellulase induced waste activated sludge and paper waste co-fermentation for efficient volatile fatty acids production and underlying mechanisms. *Bioresour Technol*. 2021;341:125771. doi 10.1016/j.biortech.2021.125771
- Lynd L.R., van Zyl W.H., McBride J.E., Laser M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol*. 2005;16(5):577-583. doi 10.1016/j.copbio.2005.08.009
- Maki M., Leung K.T., Qin W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int J Biol Sci*. 2009;5(5):500-516. doi 10.7150/ijbs.5.500
- Mathew G.M., Sukumaran R.K., Singhanian R.R., Pandey A. Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation. *J Sci Ind Res*. 2008;67(11):898-907
- Menendez E., Ramírez-Bahena M.H., Fabryová A., Igual J.M., Bena-da O., Mateos P.F., Peix A., Kolařík M., García-Fraile P. *Pseudomonas coleopterorum* sp. nov., a cellulase-producing bacterium isolated from the bark beetle *Hylesinus fraxini*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015;65(9):2852-2858. doi 10.1099/ijs.0.000344
- Milici M., Vital M., Tomasch J., Badewien T.H., Giebel H.-A., Plumeier I., Wang H., Pieper D.H., Wagner-Döbler I., Simon M. Diversity and community composition of particle-associated and free-living bacteria in mesopelagic and bathypelagic Southern Ocean water masses: evidence of dispersal limitation in the Bransfield Strait. *Limnol Oceanogr*. 2017;62(3):1080-1095. doi 10.1002/lno.10487
- Mohand-Oussaid O., Payot S., Guedon E., Gelhaye E., Youyou A., Petitdemange H. The extracellular xylan degradative system in *Clostridium cellulolyticum* cultivated on xylan: evidence for cell-free cellulosome production. *J Bacteriol*. 1999;181(13):4035-4040. doi 10.1128/jb.181.13.4035-4040.1999
- Mukherjee P.K., Horwitz B.A., Kenerley C.M. Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. *Microbiology*. 2012; 158(Pt. 1):35-45. doi 10.1099/mic.0.053629-0
- Munjal N., Jawed K., Wajid S., Yazdani S.S. A constitutive expression system for cellulase secretion in *Escherichia coli* and its use in bioethanol production. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119917. doi 10.1371/journal.pone.0119917
- Mykyteczuk N.C.S., Foote S.J., Omelon C.R., Southam G., Greer C.W., Whyteet L.G. Bacterial growth at -15°C; molecular insights from the permafrost bacterium *Planococcus halocryophilus* Or1. *ISME J*. 2013;7(6):1211-1226. doi 10.1038/ismej.2013.8
- Nishida Y., Suzuki K., Kumagai Y., Tanaka H., Inoue A., Ojima T. Isolation and primary structure of a cellulase from the Japanese sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Biochimie*. 2007;89(8):1002-1011. doi 10.1016/j.biochi.2007.03.015
- Niyonzima F.N. Detergent-compatible fungal cellulases. *Folia Microbiol*. 2021;66(1):25-40. doi 10.1007/s12223-020-00838-w
- Nyathi M., Dhlamini Z., Ncube T. Bioprospecting for cellulase-producing bacteria from Victoria falls rainforest decaying logs. *Am J Microbiol Res*. 2023;11(3):73-78. doi 10.12691/ajmr-11-3-2

- Oikawa T., Tsukagawa Y., Soda K. Endo- β -glucanase secreted by a psychrotrophic yeast: purification and characterization. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998;62(9):1751-1756. doi 10.1271/bbb.62.1751
- Okino-Delgado C.H., Zanutto-Elgui M.R., do Prado D.Z., Pereira M.S., Fleuri L.F. Enzymatic bioremediation: current status, challenges of obtaining process, and applications. In: Arora P. (Ed.) *Microbial Metabolism of Xenobiotic Compounds. Microorganisms for Sustainability.* Vol. 10. Springer, 2019;79-101. doi 10.1007/978-981-13-7462-3_4
- Olson D.G., McBride J.E., Shaw A.J., Lynd L.R. Recent progress in consolidated bioprocessing. *Curr Opin Biotechnol.* 2012;23(3):396-405. doi 10.1016/j.copbio.2011.11.026
- Ozyilmaz G., Gunay E. Clarification of apple, grape and pear juices by co-immobilized amylase, pectinase and cellulose. *Food Chem.* 2023;398:133900. doi 10.1016/j.foodchem.2022.133900
- Patel R.N., Banerjee A., Ko R.Y., Howell J.M., Li W.S., Comezoglu F.T., Partyka R.A., Szarka F.T. Enzymic preparation of (3R-cis)-3-(acetyloxy)-4-phenyl-2-azetidinone: a taxol side-chain synthon. *Biotechnol Appl Biochem.* 1994;20(1):23-33. doi 10.1111/j.1470-8744.1994.tb00304.x
- Pedone E., Limauro D., Bartolucci S. The machinery for oxidative protein folding in thermophiles. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(1):157-169. doi 10.1089/ars.2007.1855
- Peng Z.Q., Li C., Lin Y., Wu S.S., Gan L.H., Liu J., Yang S.L., Zeng X.H., Lin L. Cellulase production and efficient saccharification of biomass by a new mutant *Trichoderma afroharzianum* MEA-12. *Biotechnol Biofuels.* 2021;14(1):219. doi 10.1186/s13068-021-02072-z
- Pérez J., Muñoz-Dorado J., de la Rubia T., Martínez J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol.* 2002;5(2):53-63. doi 10.1007/s10123-002-0062-3
- Perim F.D.S., da Silva W.J., de Souza D.O., Ulhoa C.J., Rezende C.F., Dos Santos L.F., Dos Santos F.R., Silva F.G., Minafra C.S. Effects of the addition of *Trichoderma reesei* cellulase to broiler chicken diets for a 21-day period. *Animals (Basel).* 2024;14(10):1467. doi 10.3390/ani14101467
- Pinheiro B.A., Gilbert H.J., Sakka K., Sakka K., Fernandes V.O., Prates J.A., Alves V.D., Bolam D.N., Ferreira L.M., Fontes C.M. Functional insights into the role of novel type I cohesin and dockerin domains from *Clostridium thermocellum*. *J Biochem.* 2009;424(3):375-384. doi 10.1042/BJ20091152
- Podosokorskaya O.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Novikov A.A., Kolganova T.V., Kublanov I.V. *Ornatilinea apprima* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic representative of the class *Anaerolineae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63(Pt. 1):86-92. doi 10.1099/ijs.0.041012-0
- Puri M., Sharma D., Barrow C.J., Tiwary A.K. Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chem.* 2012;132(3):1113-1120. doi 10.1016/j.foodchem.2011.11.063
- Rabinovich M.L., Melnick M.S., Bolobova A.V. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry (Mosc).* 2002;67(8):850-871. doi 10.1023/a:1019958419032
- Ramakrishnan K., Johnson R.L., Winter S.D., Worthy H.L., Thomas C., Humer D.C., Spadiut O., Hindson S.H., Wells S., Barratt A.H., Menzies G.E., Pudney C.R., Jones D.D. Glycosylation increases active site rigidity leading to improved enzyme stability and turnover. *FEBS J.* 2023;290(15):3812-3827. doi 10.1111/febs.16783
- Ranjan R., Rai R., Bhatt S.B., Dhar P. Technological road map of Cellulase: a comprehensive outlook to structural, computational, and industrial applications. *Biochem Eng J.* 2023;198:109020. doi 10.1016/j.bej.2023.109020
- Reese E.T., Mandels M. Enzymic hydrolysis of cellulose and its derivatives. *Methods Carbohydr Chem.* 1963;3:139-143
- Robledo M., Jiménez-Zurdo J.I., Soto M.J., Velázquez E., Dazzo F., Martínez-Molina E., Mateos P.F. Development of functional symbiotic white clover root hairs and nodules requires tightly regulated production of rhizobial cellulase CelC2. *Mol Plant Microbe Interact.* 2011;24(7):798-807. doi 10.1094/MPMI-10-10-0249
- Rong Y., Zhang L., Chi Z., Wang X. A carboxymethyl cellulase from a marine yeast (*Aureobasidium pullulans* 98): its purification, characterization, gene cloning and carboxymethyl cellulose digestion. *J Ocean Univ China.* 2015;14:913-921. doi 10.1007/s11802-015-2574-4
- Rubin-Pitel S.B., Zhao H. Recent advances in biocatalysis by directed enzyme evolution. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2006;9(4):247-257. doi 10.2174/138620706776843183
- Sadhu S., Maiti T.K. Cellulase production by bacteria: a review. *Br Microbiol Res J.* 2013;3(3):235-258. doi 10.9734/BMRJ/2013/2367
- Sadhu S., Ghosh P.K., Aditya G., Maiti T.K. Optimization and strain improvement by mutation for enhanced cellulase production by *Bacillus* sp. (MTCC10046) isolated from cow dung. *J King Saud Univ Sci.* 2014;26(4):323-332. doi 10.1016/j.jksus.2014.06.001
- Sajith S., Priji P., Sreedevi S., Benjamin S. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. *J Nutr Food Sci.* 2016;6(1):461. doi 10.4172/2155-9600.1000461
- Sakamoto K., Touhata K., Yamashita M., Kasai A., Toyohara H. Cellulose digestion by common Japanese freshwater clam *Corbicula japonica*. *Fish Sci.* 2007;73(3):675-683. doi 10.1111/j.1444-2906.2007.01381.x
- Sangkharak K., Vangsirikul P., Jantachatt S. Strain improvement and optimization for enhanced production of cellulase in *Cellulomonas* sp. TSU-03. *Afr J Microbiol Res.* 2012;6(5):1079-1084. doi 10.5897/AJMR11.1550
- Schwarz W.H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001;56:634-649. doi 10.1007/s002530100710
- Selzer K., Hassen A., Akanmu A.M., Salem A.Z.M. Digestibility and rumen fermentation of a high forage diet pre-treated with a mixture of cellulase and xylanase enzymes. *South Afr J Anim Sci.* 2021;51(3):399-406. doi 10.4314/sajas.v51i3.14
- Sha H., Zhao B., Yang Y., Zhang Y., Zheng P., Cao S., Wang Q., Wang G. Enhanced anaerobic digestion of corn stover using magnetized cellulase combined with Ni-graphite coating. *Energy.* 2023;262(B):125532. doi 10.1016/j.energy.2022.125532
- Shankar A., Saini S., Sharma K.K. Fungal-integrated second-generation lignocellulosic biorefinery: utilization of agricultural biomass for co-production of lignocellulolytic enzymes, mushroom, fungal polysaccharides, and bioethanol. *Biomass Convers Biorefin.* 2024;14(1):1117-1131. doi 10.1007/s13399-022-02969-1
- Sharma V., Tsai M.L., Nargotra P., Chen C.W., Sun P.P., Singhan R.R., Patel A.K., Dong C.D. Journey of lignin from a roadblock to bridge for lignocellulose biorefineries: a comprehensive review. *Sci Total Environ.* 2023;861:160560. doi 10.1016/j.scitotenv.2022.160560
- Shipkowski S., Brenchley J.E. Characterization of an unusual cold-active beta-glucosidase belonging to family 3 of the glycoside hydrolases from the psychrophilic isolate *Paenibacillus* sp. strain C7. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(8):4225-4232. doi 10.1128/AEM.71.8.4225-4232.2005
- Silva T.P., de Albuquerque F.S., Dos Santos C.W.V., Franco M., Caetano L.C., Pereira H.J.V. Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. *Bioresour Technol.* 2018;270:263-269. doi 10.1016/j.biortech.2018.09.022
- Singh A., Bajar S., Devi A., Pant D. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresour Technol Rep.* 2021;14:100652. doi 10.1016/j.biteb.2021.100652
- Singh S.P., Purohit M.K., Aoyagi C., Kitaoka M., Hayashi K. Effect of growth temperature, induction, and molecular chaperones on the solubilization of over-expressed cellobiose phosphorylase from *Cellvibrio gilvus* under *in vivo* conditions. *Biotechnol Bioproc E.* 2010;15(2):273-276. doi 10.1007/s12257-009-0023-1

- Singhania R.R., Patel A.K., Pandey A. The industrial production of enzymes. In: Soetaert W., Vandamme E.J. (Eds) *Industrial Biotechnology. Sustainable Growth and Economic Success*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2010;207-225
- Sivasankar P., Poongodi S., Sivakumar K., Al-Qahtani W.H., Arokia-raj S., Jothiramalingam R. Exogenous production of cold-active cellulase from polar *Nocardiopsis* sp. with increased cellulose hydrolysis efficiency. *Arch Microbiol.* 2022;204(4):218. doi 10.1007/s00203-022-02830-z
- Souza T.V., Araujo J.N., da Silva V.M., Liberato M.V., Pimentel A.C., Alvarez T.M., Squina F.M., Garcia W. Chemical stability of a cold-active cellulase with high tolerance toward surfactants and chaotropic agent. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2015;9:1-8. doi 10.1016/j.btre.2015.11.001
- Tansey M.R. Agar-diffusion assay of cellulolytic ability of thermophilic fungi. *Arch Mikrobiol.* 1971;77(1):1-11. doi 10.1007/BF00407983
- Tian L., Conway P.M., Cervenka N.D., Cui J., Maloney M., Olson D.G., Lynd L.R. Metabolic engineering of *Clostridium thermocellum* for *n*-butanol production from cellulose. *Biotechnol Biofuels*. 2019;12:186. doi 10.1186/s13068-019-1524-6
- Tsuji A., Sato S., Kondo A., Tominaga K., Yuasa K. Purification and characterization of cellulase from North Pacific krill (*Euphausia pacifica*). Analysis of cleavage specificity of the enzyme. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2012;163(3-4):324-333. doi 10.1016/j.cbpb.2012.08.005
- Uhlir H. (Ed.) *Industrial Enzymes and Their Applications*. John Wiley & Sons, 1998
- Vieille C., Zeikus G.J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001;65(1):1-43. doi 10.1128/MMBR.65.1.1-43.2001
- Wackett L.P. Microbial industrial enzymes: an annotated selection of World Wide Web sites relevant to the topics in microbial biotechnology. *Microb Biotechnol*. 2019;12(2):405-406. doi 10.1111/1751-7915.13389
- Xu Q., Resch M.G., Podkaminer K., Yang S., Baker J.O., Donohoe B.S., Wilson C., ... Brown S.D., Lynd L.R., Bayer E.A., Himmel M.E., Bomble Y.J. Dramatic performance of *Clostridium thermocellum* explained by its wide range of cellulase modalities. *Sci Adv*. 2016;2(2):e1501254. doi 10.1126/sciadv.1501254
- Xu X., Li J., Shi P., Ji W., Liu B., Zhang Y., Yao B., Fan Y., Zhang W. The use of T-DNA insertional mutagenesis to improve cellulase production by the thermophilic fungus *Hemicella insolens* Y1. *Sci Rep*. 2016;6:31108. doi 10.1038/srep31108
- You Y.W., Wang T.H. Cloning and expression of endoglucanase of marine cold-adapted bacteria *Pseudoalteromonas* sp. MB-1. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2005;45(1):142-144 (in Chinese)
- Yu D., Ma X., Huang Y., Jiang L., Wang L., Han C., Yang F. Immobilization of cellulase on magnetic nanoparticles for rice bran oil extraction in a magnetic fluidized bed. *Int J Food Eng*. 2022;18(1):15-26. doi 10.1515/ijfe-2021-0111
- Zanuso E., Ruiz H.A., Domingues L., Teixeira J.A. Magnetic nanoparticles as support for cellulase immobilization strategy for enzymatic hydrolysis using hydrothermally pretreated corn cob biomass. *BioEnergy Res*. 2022;15(4):1946-1957. doi 10.1007/s12155-021-10384-z
- Zeng R., Xiong P., Wen J. Characterization and gene cloning of a cold-active cellulase from a deep-sea psychrotrophic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. DY3. *Extremophiles*. 2006;10(1):79-82. doi 10.1007/s00792-005-0475-y
- Zhang Q., Liu N., Wang S., Liu Y., Lan H. Effects of cyclic cellulase conditioning and germination treatment on the γ -aminobutyric acid content and the cooking and taste qualities of germinated brown rice. *Food Chem*. 2019;289:232-239. doi 10.1016/j.foodchem.2019.03.034
- Zhang Y.H.P., Himmel M.E., Mielenz J.R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol Adv*. 2006;24(5):452-481. doi 10.1016/j.biotechadv.2006.03.003
- Zhao C.H., Liu X., Zhan T., He J. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from pretreated straw and furfural residues. *RSC Advances*. 2018;8(63):36233-36238. doi 10.1039/C8RA05936E
- Zhao H., Chockalingam K., Chen Z. Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol*. 2002;13(2):104-110. doi 10.1016/s0958-1669(02)00291-4
- Zheng F., Tu T., Wang X., Wang Y., Ma R., Su X., Xie X., Yao B., Luo H. Enhancing the catalytic activity of a novel GH5 cellulase GtCel5 from *Gloeophyllum trabeum* CBS 900.73 by site-directed mutagenesis on loop 6. *Biotechnol Biofuels*. 2018;11:76. doi 10.1186/s13068-018-1080-5

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 17.11.2025. После доработки 02.12.2025. Принята к публикации 05.12.2025.