

УДК 577.152: 577.113: 579.252

## ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ *Penicillium canescens* С ВЫСОКОЙ СПОСОБНОСТЬЮ К ГИДРОЛИЗУ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

© 2012 г. П. В. Волков\*, А. М. Рожкова\*, А. Г. Правильников\*, Р. М. Андрианов\*, Г. С. Доценко\*\*, А. О. Беккаревич\*\*\*, А. В. Кошелев\*\*\*, О. Н. Окунев\*\*\*, И. Н. Зоров\*, А. П. Синицын\*\*

\*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071  
e-mail: inbi@inbi.ras.ru

\*\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119999  
e-mail: info@rector.msu.ru

\*\*\*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, Пуцино, 142290,

Поступила в редакцию 11.03.2011 г.

Получены ферментные препараты на основе рекомбинантных штаммов *Penicillium canescens*, обладающие активностью целлобиогидролазы I, II, эндо-1,4-β-глюканазы *Penicillium verruculosum* и β-глюкозидазы *Aspergillus niger*. Показано, что для наиболее эффективного гидролиза измельченной осиновой древесины оптимальным соотношением ферментных препаратов целлобиогидролазы и эндо-1,4-β-глюканазы является 8 : 2 (по белку). Установлено также, что необходимым компонентом ферментного комплекса для гидролиза гемицеллюлозной матрицы осиновой древесины является гомологичная ксиланаза, секретируемая грибом *Penicillium canescens*.

Возрастающий дефицит запасов ископаемого сырья вынуждает проводить поиск альтернативных источников энергии, рассматривать использование возобновляемого растительного сырья, в том числе различных видов древесины, соломы и другие отходы промышленности и сельского хозяйства для получения биотоплива.

Один из способов превращения растительного сырья в полезные продукты заключается в его ферментативном гидролизе и дальнейшей (био)конверсии сахаров в органические кислоты и их производные, аминокислоты, эфиры, спирты (биотопливо) и другие продукты [1]. Глубокая биоконверсия целлюлозосодержащего растительного сырья в сахара осуществляется под действием полиферментного комплекса карбогидраз, включающего эндоглюканазы, целлобиогидролазы и β-глюкозидазы (целлобиазы). Качественный и количественный состав этого комплекса, а также активность входящих в него ферментов, определяют эффективность гидролиза целлюлозосодержащих субстратов. Следует учитывать, что для каждого конкретного вида растительного сырья существует оптимальное соотношение ключевых гидролитических ферментов, позволяющее достигать наиболее глубокой конверсии с максимальным выходом сахаров [2].

Ранее было установлено, что мицелиальный гриб *Penicillium verruculosum* секретирует комплекс гидролитических ферментов, таких, как целлобио-

гидролаза I и II (**ЦБГ I** и **ЦБГ II**) и эндоглюканаза II (**ЭГ II**), обладающих высокой осаживающей активностью [2]. Однако β-глюкозидаза *P. verruculosum*, являющаяся одним из ключевых ферментов целлюлозного комплекса и осуществляющая гидролиз промежуточного продукта конверсии целлюлозы – целлобиозы до глюкозы, является минорным ферментом и не обладает достаточной высокой активностью по отношению к целлобиозе, в отличие от β-глюкозидазы *Aspergillus niger* [3]. Более того, штамм *P. verruculosum* характеризуется относительно длительным временем культивирования и требует осуществления процесса ферментации с подпиткой, что затрудняет контроль процесса культивирования.

Одним из подходов к созданию полиферментного комплекса карбогидраз, имеющего оптимальное соотношение целлюлолитических ферментов для гидролиза конкретного вида растительного сырья, является использование смесей ферментных препаратов (**ФП**), каждый из которых обладает повышенной активностью определенного фермента, необходимого компонента комплекса [4]. Такие **ФП** можно получать на основе рекомбинантного штамма гриба *Penicillium canescens*, являющегося лабораторной моделью для получения штаммов-продуцентов целевых ферментов. По сравнению с другими грибами данный штамм имеет ряд преимуществ: обладает более высокой скоростью роста и синтеза внекле-

точных ферментов; штамм выращивается на простой и дешевой среде со свекловичным жомом; процесс ферментации легко масштабируется; получен штамм-реципиент с ауксотрофным признаком селекции; отработана система экспрессии и трансформации штамма экзогенной ДНК [5].

Цель работы – получение ФП на основе штаммов *P. canescens* с гетерологичной экспрессией ЦБГ I и II, ЭГ II *P. verruculosum* и  $\beta$ -глюкозидазы *A. niger* (БГЛ), а также оптимизация состава препарата для эффективного осахаривания модельного субстрата – микрокристаллической целлюлозы, а также природного сырья – измельченной осинового древесины.

### МЕТОДИКА

**Штаммы микроорганизмов.** В работе использовали *P. canescens* PCA10 ( $\Delta$ niaD) – ауксотрофный штамм по гену *niaD*<sup>-</sup>, ответственному за синтез фермента нитратредуктазы, реципиентный для плазмидной трансформации. Штамм *P. verruculosum* 221-151 использовали для выделения геномной ДНК, являющейся матрицей для амплификации генов *cbh1*, *cbh2*, *egl2*, кодирующих ЦБГ I, ЦБГ II, ЭГ II соответственно. Штамм *Aspergillus niger* – для выделения геномной ДНК, являющейся матрицей для амплификации гена *bgl1*, кодирующего синтез БГЛ.

**Ферментные препараты.** Использовали сухие ФП, полученные лиофильным высушиванием культуральных жидкостей исходного штамма *P. canescens* PCA-10 и рекомбинантных штаммов с гетерологичными генами *cbhI* (PCA-ЦБГI), *cbhII* (PCA-ЦБГII), *eglI* (PCA-ЭГII) *P. verruculosum* и *bglI* (PCA-БГЛ) *A. niger*, выращенных на среде, содержащей (%): свекловичный жом – 3.0, пептон – 5.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2.5. Культивирование проводили в 1 л ферментерах в течение 5 сут при 28°C. Сухие ФП были получены в ИБФМ РАН (Пушино, Россия).

**Определение биохимических характеристик.** Электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях в 12%-ном ПААГ в присутствии Na-ДДС на приборе Mini Protean (“Bio-Rad”, США). Белковые полосы в гелях окрашивали ку-масси бриллиантовым синим G-250 (“Ferak”, Германия). Перед электрофорезом исследуемые растворы ферментов предварительно обрабатывали 1%-ным ДДС-Na и 5%-ным  $\beta$ -меркаптоэтанолом при 100°C в течение 5–10 мин. В качестве стандартов использовали смесь белков MW-SDS-118 (19–118 кДа, “Fermentas”, Литва).

**Определение ферментативных активностей.** Активность ферментов определяли по отношению к МКЦ (целлобиогидролаза), Na-соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) (эндоглюканаза), глю-

куроноксилазу березы (ксиланаза) при 50°C и pH 5 по начальной скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС). Концентрацию ВС определяли методом Шомоди–Нельсона [6]. Концентрация полисахаридного субстрата в реакционной смеси составляла 5 г/л.

Активность ферментов по отношению к п-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозиду (ПНФГ) определяли по начальной скорости образования п-нитрофенола (ПНФ) по методике [7]. Раствор 0.05 М субстрата в 0.1 М, Na-ацетатном буфере, pH 5.0, инкубировали с ферментом при 40°C в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 1.0 М раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Образовавшийся в растворе ПНФ определяли спектрофотометрически при 400 нм, используя коэффициент молярного поглощения.

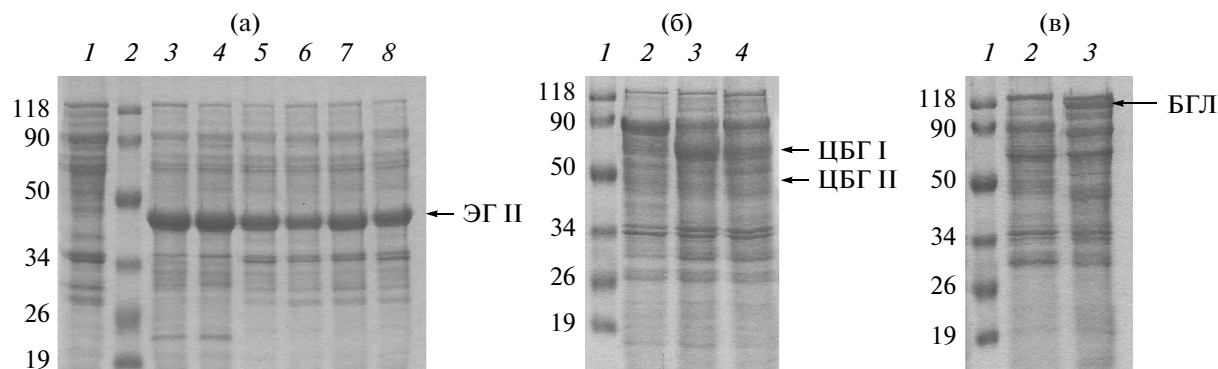
Активность целлобиазы определяли, инкубируя 2.5 мМ раствор целлобиозы с ферментом и отбирая пробы для определения концентрации глюкозы через 5, 10 и 15 мин. Концентрацию глюкозы (Гл) определяли глюкозооксидазно-пероксидазным методом [6].

Активность ферментов выражали в международных единицах. За 1 единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализует образование 1 мкмоль продукта за 1 мин при действии ферментов на соответствующий субстрат.

Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта БСА.

**Определение моно-, ди- и олигосахаридов в гидролизатах измельченной осинового древесины.** При гидролизе осинового древесины ферментными препаратами через 48 ч реакции отбирались пробы. Анализ сахаров в пробах проводили с использованием хроматографической системы Agilent 1100 (“Agilent”, США) с электрохимическими детектором Coulochem III (“ESA”, США) с колонкой CarboPac PA-20 (“Dionex”, США). Образцы наносили в 7 мМ растворе NaOH. Илюцию проводили в изократическом режиме в течение первых 7 мин, затем линейным градиентным до 40 мМ NaOH в течение 15 мин. Детектирование проводили в режиме пульсирующей амперометрии (+100 мВ 400 мс, –2000 мВ 20 мс, +600 мВ 30 мс, –100 мВ 50 мс). Калибровку для идентификации и расчета концентрации сахаров в анализируемых образцах проводили с использованием стандартов D-глюкозы, D-ксилозы, D-маннозы, L-арабинозы, D-галактозы, 1,4- $\beta$ -D-ксилобиозы, 1,4- $\beta$ -D-ксилотриозы и целлобиозы (“Serva”, “Merck”, Германия).

**Растительные субстраты.** В качестве субстратов были использованы: измельченная предобработанная осинового древесины и МКЦ (ООО “МК Центр”, Дзержинск). Измельчение осинового



**Рис. 1.** ДДС-электрофорез ферментных препаратов *P. canescens*. (а) – ФП РСА: 1 – РСА10, 2 – белковый маркер, 3 – ЭГП-1, 4 – ЭГП-2, 5 – ЭГП-3, 6 – ЭГП-4, 7 – ЭГП-5, 8 – ЭГП-6; (б) – ФП РСА: 1 – маркер, 2 – ЦБГ I, 3 – ЦБГ II, 4 – РСА10; (в) – ФП РСА: 1 – маркер, 2 – РСА10, 3 – БГЛ.

древесины проводили в ГосНИИ синтезбелок (Москва) на планетарной мельнице-активаторе типа АГО-2С, размер частиц после помола составлял 1–3 мкм.

**Проведение гидролиза растительных субстратов.** Эксперимент проводили в термостатируемой при 50°C ячейке, помещенной в шейкер “INNOVA 40 Thermo Shaker” (США). Концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 100 г/л (в пересчете на сухое вещество). Реакцию проводили в 0.1 М ацетатном буфере при перемешивании (250 об/мин). В реакционную смесь добавляли следующие ферментные препараты (в расчете на белок): РСА-ЦБГ I : РСА-ЭГ II и РСА-ЦБГ II : РСА-ЭГ II в соотношениях: 2 : 8, 4 : 6, 6 : 4, 8 : 2 соответственно. Конечная концентрация белка в реакционной смеси составляла 10 мг/г сухого субстрата, объем реакционной смеси – 20 мл. В реакционную смесь добавляли также ФП целлюлазы РСА-БГЛ из расчета 40 ед. активности на 1 г сухого субстрата. Гидролиз проводили в течение 2 сут. В контроль вместо раствора ФП в реакционную смесь добавляли соответствующее количество буферного раствора.

Реакционная ячейка представляла собой пластиковый сосуд с крышкой объемом 50 мл, для обеспечения дополнительного перемешивания реакционной смеси в ячейку помещали металлический цилиндр ( $d = 7$  мм,  $h = 10$  мм) из нержавеющей стали.

Через определенные промежутки времени (3, 12 и 24 ч) из реакционной смеси отбирали пробы (по 0.5 мл), центрифугировали 3 мин при 10000 g и измеряли в супернатанте концентрацию ВС методом Шомоди–Нельсона [6] и Гл глюкозооксидазным методом [7].

**Анализ состава ферментного препарата.** Для фракционирования ФП использовали систему высокоэффективной жидкостной хроматографии

(FPLC), колонки и носители фирмы “Pharmacia” (Швеция). Для подготовки образцов, а также для их обессоливания и замены буфера использовали систему низкого давления Econo-System фирмы “BioRad” (США). ФП осаждали при 80% насыщения сульфатом аммония, затем обессоливали на колонке с носителем Биогель-Р4 (“BioRad”, США). Колонку уравнивали 20 мМ буфером Bis-Tris-HCl, pH 6.8, далее проводили анионообменную хроматографию на колонке с носителем Source 15Q (“Pharmacia”, Швеция). Образец наносили в стартовом буфере Bis-Tris-HCl при pH 6.8, связавшиеся белки элюировали в градиенте концентрации NaCl от 0 до 0.4 М. Несвязавшиеся с Source 15Q белки подвергали фракционированию с помощью гидрофобной хроматографии на колонке Source 15ISO. Белковую фракцию наносили на колонку при начальной концентрации сульфата аммония 1.4 М в 50 мМ Na-ацетатном буфере, pH 5.0. Элюирование белков проводили в линейном от 1.4 до 0 М градиенте сульфата аммония. В полученных фракциях измеряли активность по отношению к МКЦ, КМЦ, ксилану и ПНФГ, а также определяли концентрацию белка.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Свойства ферментных препаратов.** Используя методы генной инженерии и микробиологии в исходный штамм-реципиент были трансформированы экспрессионные плазмиды, несущие гены ЦБГ I (*cbh1*), ЦБГ II (*cbh2*), ЭГ II (*egl2*) *P. verruculosum* и БГЛ (*bglI*) *A. niger* под контролем промотора гена ксиланазы (*xylA*) *P. canescens* [2–4]. Из культуральной жидкости новых штаммов-продуцентов были получены лиофильно высушенные сухие ФП РСА-ЦБГ I, РСА-ЦБГ II, РСА-ЭГ II и РСА-БГЛ. В качестве контроля был использован ФП, полученный с помощью штамма-реципиента *P. canescens* – РСА-10. ДДС-элек-

Таблица 1. Характеристика активности препаратов

Ферментный препарат	КМЦаза, ед./мг белка	Авицелаза, ед./мг белка	Целлобиаза, ед./мг белка	Ксиланаза, ед./мг белка	$\beta$ -глюкозидаза, ед./мг белка
РСА-ЭГП-6	20.3 $\pm$ 1.0	0.29 $\pm$ 0.01	0.030 $\pm$ 0.001	8.4 $\pm$ 0.6	0.050 $\pm$ 0.002
РСА-ЦБГ I	3.9 $\pm$ 0.5	0.51 $\pm$ 0.03	0.30 $\pm$ 0.05	48.5 $\pm$ 3.0	0.20 $\pm$ 0.01
РСА-ЦБГ II	5.1 $\pm$ 0.5	0.45 $\pm$ 0.03	0.32 $\pm$ 0.05	55.1 $\pm$ 3.0	0.30 $\pm$ 0.01
РСА-БГЛ	0.7 $\pm$ 0.1	0.050 $\pm$ 0.001	30.2 $\pm$ 2.0	2.6 $\pm$ 0.4	5.8 $\pm$ 0.4
РСА-10	2.9 $\pm$ 0.1	0.070 $\pm$ 0.002	0.070 $\pm$ 0.002	80.4 $\pm$ 4.0	0.10 $\pm$ 0.01

трофорез ферментных препаратов представлен на рис. 1. На электрофореграммах присутствуют полосы белков, не свойственных секретируемому ферментному комплексу *P. canescens*, такие, как ЭГП ~40 кДа (рис. 1а), ЦБГ I и ЦБГ II в пределах 70 и 60 кДа соответственно (рис. 1б), а также БГЛ ~120 кДа (рис. 1в).

Содержание белка и удельная активность ФП по отношению к различным субстратам представлены в табл. 1. Активности целлобиогидролазы, эндоглюканызы и  $\beta$ -глюкозидазы (целлобиазы) определяли по гидролизу МКЦ, КМЦ, целлобиозы и ПНФГ соответственно [7]. Очевидно, что ФП с гетерологичными ЦБГ I и II имели в 7.3 и 6.5 более высокую удельную активность по отношению к МКЦ (0.51 и 0.45 ед./мг), чем контрольный ФП РСА-10. ФП с гетерологичной ЭГ II имел 22.5 раз более высокую активность по отношению к КМЦ (20.3 ед./мг) по сравнению с ФП РСА-10. ФП с БГЛ *A.niger* имел в 58 и 430 раз более высокую активность по ПНФГ и целлобиозе 5.8 и 30.2 ед./мг соответственно по сравнению с контрольным ФП РСА-10.

**Осахаривающая способность ферментных препаратов.** Осахаривающую способность полученных ФП определяли по отношению к МКЦ и измельченной осиновой древесине в качестве субстратов.

Для определения оптимального соотношения ФП с активностью целлобиогидролазы и эндоглюканызы, при котором будет наблюдаться их максимальная гидролитическая активность, ФП смешивали в соотношении: 2 : 8, 4 : 6, 6 : 4, 8 : 2 мг/г сухой массы субстрата (первая цифра соответствует количеству препарата по белку с ЦБГ I или ЦБГ II, вторая – с эндоглюканызой). Общее количество белка ФП во всех случаях составляло 10 мг/г сухой массы субстрата.

В качестве критерия осахаривающей способности препаратов принимали выход ВС и Гл через 48 ч после начала гидролиза.

Из шести полученных ФП с активностью гетерологичной эндоглюканызы при гидролизе из-

мельченной осиновой древесины и МКЦ, лучшим по выходу ВС и Гл, как видно из рис. 2, был препарат РСА-ЭГП-6. Этот препарат обеспечивал увеличение выхода ВС и Гл в 3 раза при гидролизе измельченной осиновой древесины по сравнению с контрольным ФП РСА-10. При гидролизе МКЦ препарат РСА-ЭГП-6 также проявлял большую осахаривающую активность и обеспечивал выход ВС и Гл в 4 и 3 раза больше соответственно по сравнению с контролем, поэтому ФП РСА-ЭГП-6 был выбран для дальнейших экспериментов по осахариванию целлюлозосодержа-

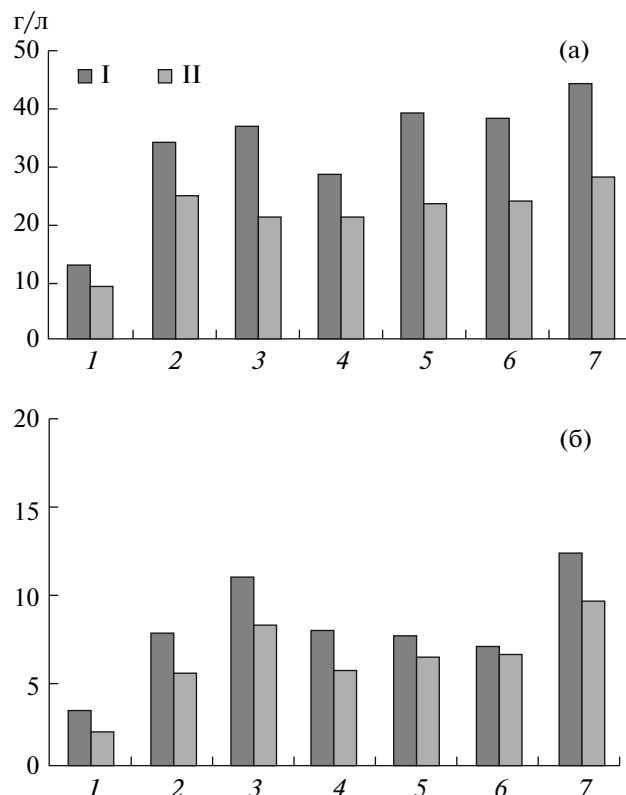
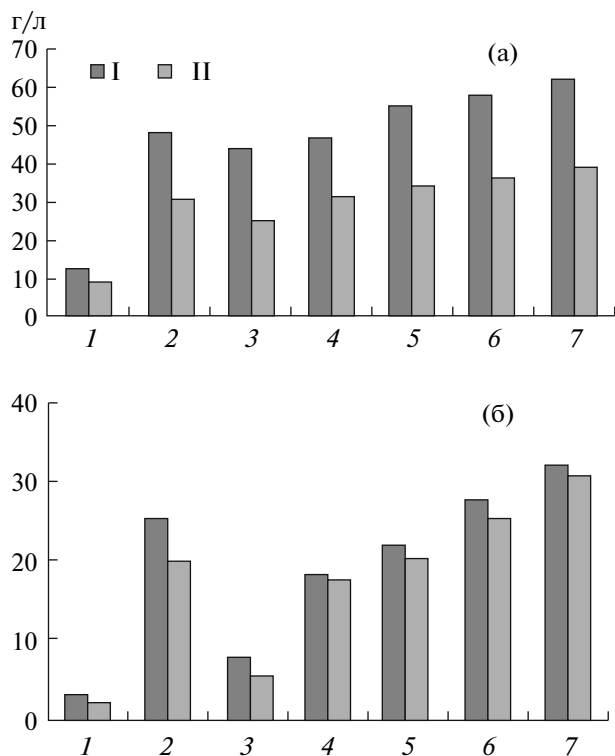
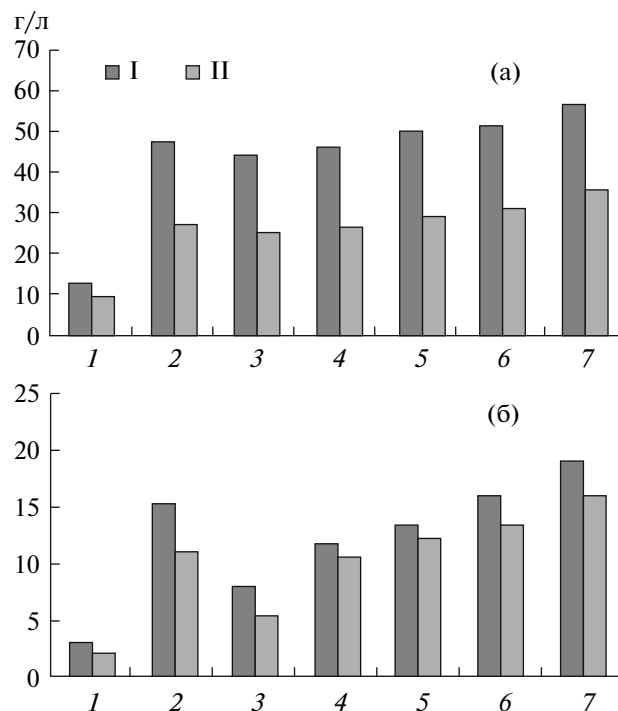


Рис. 2. Выход ВС (I) и Гл (II) при гидролизе измельченной осиновой древесины (а) и МКЦ (б) ФП РСА-ЭГП. 1 – РСА10, 2 – ЭГП-1, 3 – ЭГП-2, 4 – ЭГП-3, 5 – ЭГП-4, 6 – ЭГП-5, 7 – ЭГП-6.



**Рис. 3.** Выход ВС (I) и Гл(II) при гидролизе измельченной осиновой древесины (а) и МКЦ (б) ФП PCA-ЦБГ. 1 – PCA (10 мг), 2 – ЦБГ I (10 мг), 3 – ЭГ II (10 мг), 4 – 2 : 8, 5 – 4 : 6, 6 – 6 : 4, 7 – 8 : 2.



**Рис. 4.** Выход ВС (I) и Гл (II) при гидролизе измельченной осиновой древесины (а) и МКЦ (б) ФП PCA-ЦБГ. 1 – PCA 10 мг, 2 – ЦБГ II – 10 мг, 3 – ЭГ II – 10 мг, 4 – 2 : 8, 5 – 4 : 6, 6 – 6 : 4, 7 – 8 : 2. Условия гидролиза см. в “Методике”.

ших материалов (**ЦСМ**) смесями ферментных препаратов.

Наиболее эффективным соотношением ФП, при котором наблюдались максимальные значения ВС и Гл было 8 мг (по белку) препарата целлобиогидролазы (как ЦБГ I, так и ЦБГ II) к 2 мг препарата ЭГ II. Как видно из рис. 3а, при гидролизе измельченной осиновой древесины ферментной смесью в соотношении 8 : 2 (PCA-ЦБГ I и PCA-ЭГ II) выход ВС и Гл составил 62 и 38 г/л соответственно, что в 5 и 4 раза больше чем при гидролизе того же субстрата контрольным ФП PCA-10. При гидролизе того же субстрата ферментной смесью, содержащей PCA-ЦБГ II и PCA-ЭГ II выход ВС и Гл (рис. 4а) составил 56 и

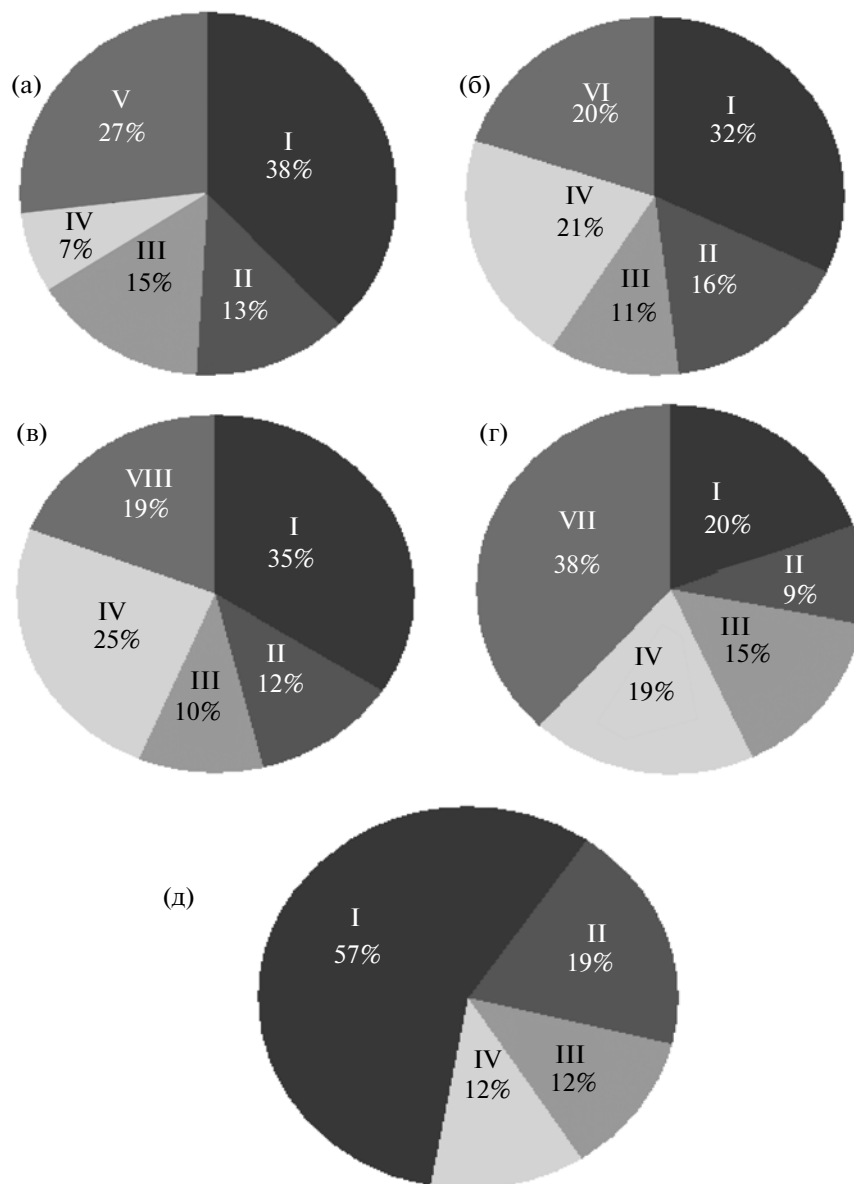
35 г/л соответственно, что в 4.5 и 4 раза больше контроля.

При осахаривании модельного субстрата – МКЦ выбранное ранее соотношение оказалось оптимальным – 8 мг препарата PCA-ЦБГ I и 2 мг препарата PCA-ЭГ II. Выход ВС и Гл при использовании этой смеси ФП составил 31 и 30 г/л соответственно, что в 9 и 13 раз больше контроля. При гидролизе ферментной смесью, содержащей PCA-ЦБГ II и PCA-ЭГ II, в том же соотношении выход ВС и Гл составил 19 и 16 г/л соответственно, что в 5.5 и 7 раз больше контроля (рис. 4б).

**Состав сахаров в гидролизатах осиновой древесины.** Гидролизат измельченной осиновой древесины, полученный при применении наиболее ак-

**Таблица 2.** Состав сахаров в гидролизате измельченной осины через 48 ч гидролиза

Ферментная смесь, мг/г субстрата	Концентрация сахаров, г/л			
	ВС	глюкоза	целлобиоза	ксилоза
ЦБГ I + ЭГ II (8 : 2) + БГЛ (40 ед.)	62.1 ± 3.1	38.5 ± 1.3	3.10 ± 0.03	9.2 ± 0.1
ЦБГ II + ЭГ II (8 : 2) + БГЛ (40 ед.)	56.3 ± 2.3	35.2 ± 1.1	2.60 ± 0.15	8.40 ± 0.08
PCA + БГЛ (40 ед.)	26.1 ± 1.1	17.8 ± 0.5	2.5 ± 0.2	4.90 ± 0.05



**Рис. 5.** Компонентный состав сухих ФП по данным FPLC-фракционирования (в % от общего содержания белка). (а) РСА-ЦБГ I, (б) РСА-ЦБГ II, (в) РСА-БГЛ, (г) РСА-ЭГП-6, (д) РСА-10. I – ксиланаза, II –  $\beta$ -галактозидаза, III – арабинофуранозидаса, IV – другие белки, V – ЦБГ I, VI – ЦБГ II, VII – ЭГП, VIII – БГЛ.

тивной ферментной смеси, содержащей 8 мг ЦБГ I (или ЦБГ II) и 2 мг ЭГП был проанализирован с помощью ВЭЖХ. В составе гидролизата были обнаружены глюкоза (35.2–38.5 г/л, табл. 2), являющаяся основной структурной единицей целлюлозы глюкоанов, и ксилоза (8.5–9.2 г/л), структурный элемент ксилана, основного компонента гемицеллюлозы осиновой древесины. Данные табл. 2 полностью коррелируют с составом основных полимеров осиновой древесины [1]. Следует отметить,

что присутствие в среде незначительного количества целлюлозы (2.5–3.0 г/л) свидетельствует о достаточном количестве в реакционной смеси препарата РСА-БГЛ (40 ед./г сухого субстрата).

**Состав ферментных препаратов.** Было проведено двухстадийное аналитическое фракционирование сухих ФП препаратов РСА-10, РСА-ЦБГ I, РСА-ЦБГ II, РСА-БГЛ, а также препарата РСА-ЭГП-6, обладающего лучшей осаживающей способностью при использовании в качестве суб-

стратов измельченной осиновой древесины и МКЦ.

Фракционирование проводили, как описано в методике, использовали одинаковое количество белка (10 мг). В полученных фракциях определяли активность по отношению к МКЦ, КМЦ, активность ксиланазы и  $\beta$ -глюкозидазы,  $\beta$ -галактозидазы, арабинофуранозидазы, а также содержание белка. Зная общую активность соответствующей фракции и общее содержание в ней белка, а также учитывая удельную активность ферментов (гомогенных целлобиогидролаз, эндоглюканаз,  $\beta$ -глюкозидазы и других секретируемых ферментов *P. canescens* [2, 8]) рассчитывали содержание соответствующего фермента в общем пуле секретируемого белка с целью определения компонентного состава полученных ФП.

На рис. 5 приведен компонентный состав ФП. Препараты РСА-ЦБГ I и РСА-ЦБГ II содержали 20–27% гетерологичных целлобиогидролаз I, II от общего пула секретируемого белка. При этом содержание собственной (гомологичной) ксиланазы *P. canescens* составляло 32–38%. Состав лучшего эндоглюканазного ФП РСА-ЭГП-6 характеризовался значительным содержанием гетерологичной эндоглюканазы (38,3%) при сохранении высокого уровня собственной ксиланазы *P. canescens* (19,5%). Препарат РСА-БГЛ имел 33% гетерологичной  $\beta$ -глюкозидазы *A. niger*. В исходном (контрольном) ФП РСА-10 отмечалось наибольшее содержание собственной ксиланазы (57%) и отсутствие целлюлолитических ферментов.

Полученные с помощью фракционирования на FPLC данные по составу ФП коррелируют с данными табл. 1, отражающей активности ФП по отношению к различным субстратам – препараты с увеличенным содержанием целлобиогидролазы имеют увеличенную активность по МКЦ, с увеличенным содержанием эндоглюканаз – увеличенную КМЦазную активностью, с увеличенным содержанием  $\beta$ -глюкозидазы – увеличенную активность по ПНФГ. Следует отметить, что увеличенная активность ксиланазы в препаратах РСА-ЦБГ I и РСА-ЦБГ II объясняется большим содержанием целлобиогидролаз, которые, как показано в работе [9], обладают также ксиланазной активностью.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами были получены ФП на основе гриба *P. canescens*, характеризующиеся значительным содержанием гетерологичных ферментов ЦБГ I, ЦБГ II, ЭГ II *P. verruculosum* и БГЛ *A. niger*, а также проведена оптимизация состава смесей целлюлолитических ФП для гидролиза МКЦ и измельченной осиновой древесины. Уста-

новлено, что для наиболее эффективного осахаривания целлюлозосодержащих субстратов оптимальным было соотношение 8 мг (по белку) препаратов ЦБГ I или ЦБГ II к 2 мг препарата ЭГ II в расчете на 1.0 г сухой массы субстрата. Следует отметить, что при ферментативном гидролизе измельченной осиновой древесины важную роль в увеличении выхода продуктов реакции сыграло присутствие в ферментном гидролитическом комплексе значительного количества собственной (гомологичной) ксиланазы *P. canescens*, что позволило гидролизовать также и гемицеллюлозу осиновой древесины, составляющую 15% от массы данного субстрата.

Работа была выполнена при частичной финансовой поддержке ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (2009–2013 гг.) и программы ПНР-5.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kumar R., Singh S., Singh O.V. // J. Industrial Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 35. № 5. P. 377–91.
2. Скомаровский А.А., Марков А.В., Гусаков А.В., Кондратьева Е.Г., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Матвеев В.Ю., Сеницын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 6. С. 674–680.
3. Короткова О.Г., Семенова М.В., Морозова В.В., Зоров И.Н., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Сеницын А.П. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 5. С. 699–70.
4. Скомаровский А.А., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Соловьева И.В., Бубнова Т.В., Кондратьева Е.Г., Сеницын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 2. С. 210–212.
5. Рожкова А.М., Волков П.В., Кондратьева Е.А., Сатрутдинов А.Д., Рубцова Е.А., Бушина Е.А., Зоров И.Н., Сеницына О.А., Сеницын А.П., Кошелев А.В., Беккаревич О.А., Бубнова Т.В., Окунев О.Н. // Хранение и переработка сельхозсырья. 2010. № 7. С. 37–39.
6. Сеницын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов. Итоги науки и техники. Сер. “Биотехнология”. М.: ВИНТИ, 1990. Т. 25. С. 30–37.
7. Польшалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов. М.: ДеЛи Принт, 2003. С. 147–169.
8. Патент РФ. 2009. № 2358756.
9. Патент РФ. 2008. № 2322354.

## Production of Enzyme Preparations on the Basis of *Penicillium canescens* Recombinant Strains with a High Ability for the Hydrolysis of Plant Materials

P. V. Volkov<sup>a</sup>, A. M. Rozhkova<sup>a</sup>, A. G. Pravilnikov<sup>a</sup>, R. M. Andrianov<sup>a</sup>, G. S. Dotsenko<sup>b</sup>,  
A. O. Bekkarevich<sup>c</sup>, A. V. Koshelev<sup>c</sup>, O. N. Okunev<sup>c</sup>, I. N. Zorov<sup>a</sup>, and A. P. Sinitsin<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*e-mail: inbi@inbi.ras.ru*

<sup>b</sup> *Faculty of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119999 Russia*

*e-mail: info@rector.msu.ru*

<sup>c</sup> *Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, Moskovskaya oblast, 142290 Russia*

Received March 11, 2011

**Abstract**—An enzyme preparation has been produced on the basis of *Penicillium canescens* strains with the activity of cellobiohydrolase I, II; endo-1,4- $\beta$ -glucanase of *Penicillium verruculosum*; and  $\beta$ -glucosidase of *Aspergillus niger*. It was shown that for the most effective hydrolysis of aspen wood pulp the optimal ratio of cellobiohydrolase and endo-1,4- $\beta$ -glucanase in enzyme preparations was 8 : 2 (by protein). It was also established that the homologous xylanase secreted by the *Penicillium canescens* fungus is a required component for the enzyme complex for hydrolysis of the hemicellulose matrix of aspen wood.