

УДК 579.254.2, 663.15, 544.473:577.15

СОЗДАНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПЕКТИНАЗ И ЦЕЛЛЮЛАЗ ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ СВЕКЛОВИЧНОГО ЖОМА

© 2012 г. Е. В. Бушина*, А. М. Рожкова**, И. Н. Зоров**, А. Д. Сатрутдинов**,
А. О. Беккаревич***, А. В. Кошелев***, О. Н. Окунев***, А. П. Сеницын*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991
e-mail: info@rector.msu.ru

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

***Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пуццо, 142290
Поступила в редакцию 08.11.2011 г.

На основе рекомбинантных штаммов грибов *Penicillium canescens*, получены комплексные ферментные препараты, обладающие активностью гомологичной пектинлиазы А, гетерологичных эндо-1,4-β-глюканазы *Penicillium verruculosum* и β-глюкозидазы *Aspergillus niger*. В работе были реализованы два подхода: создание ферментного препарата на основе нового штамма – продуцента всех трех ферментов и получение ферментного препарата путем совместного культивирования трех штаммов – продуцентов каждого отдельного фермента.

Проведено сравнение осаживающей способности этих ферментных препаратов по отношению к свекловичному жому. Наибольшей эффективностью обладал ферментный препарат, полученный в результате совместного культивирования штаммов – (моно)продуцентов, по сравнению с ферментным препаратом, полученным с помощью штамма-продуцента трех ферментов.

Свекловичный жом – отход сахарного производства России, очень малая часть которого (15% на основании данных Росстата за 2008 год, www.gks.ru) используется как кормовая добавка, большая же часть остается невостребованной. Экологически безопасным и экономически оправданным способом утилизации свекловичного жома и подобных ему отходов пищевой промышленности является превращение полисахаридов растительной клеточной стенки в сахара, которое может быть осуществлено комплексом ферментов – карбогидраз. Поскольку клеточная стенка в составе свекловичного жома содержит 8.4% пектиновых веществ, 20.1% целлюлозы и 37.4% гемицеллюлозы [1], очевидно, что предназначенный для ее гидролиза ферментный препарат (ФП), должен быть обогащен карбогидразами, расщепляющими основные полисахариды клеточной стенки – целлюлозу и гемицеллюлозу, а также пектиназой, разрушающей сеть пектиновых веществ.

На протяжении последних лет рекомбинантный штамм *P. canescens* широко используется в качестве лабораторного штамма для получения различных типов ФП [2, 3]. К преимуществам использования данного штамма относятся активный комплекс гемицеллюлаз, дешевая среда культивирования, простота процесса ферментации [4], отработанные методики трансформации

экзогенной ДНК, что делает штамм-реципиент *P. canescens* удобной системой для получения комплексных ФП пектиназ, целлюлаз и гемицеллюлаз.

Цель работы – получение комплексных ФП, обогащенных активностями пектинлиазы и целлюлазы на основе рекомбинантных штаммов *P. canescens* и сравнение их способности к осаживанию свекловичного жома.

МЕТОДИКА

Штаммы микроорганизмов. Штамм-реципиент для плазмидной трансформации – мутантный штамм *P. canescens* RN_niaD⁽⁻⁾ с дефектом в гене *niaD*, кодирующем фермент нитратредуктазу. Штамм *E. coli* Mach-1 (ΔrecA1398 endA1 tonA Ф80ΔlacM15 ΔlacX74 hsdR(r_k⁻m_k⁺) (“Invitrogen”, США) использовали для субклонирования генов пектинлиазы и целлюлаз, а также для препаративной наработки ДНК.

Плазмидные конструкции. Экспрессионные плазмидные конструкции pEGII и pβGlu с целевыми генами эндо-1,4-β-эндоглюканазы *P. verruculosum* (ЭГП) и β-глюкозидазы *A. niger* (БГП) под гомологичным ксиланазным промотором штамма *P. canescens* были получены ранее в лаборатории биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН [2].

Плазмида pPelA с геном пектинлиазы А *P. canescens* (ПЕЛ) была получена путем амплификации гена ПЕЛ методом полимеразной

цепной реакции (ПЦР) из геномной ДНК штамма *P. canescens* с использованием олигонуклеотидов:

pepA-UpLIC: caaacagaagcaaccgacacaatgggtgtcttcagccagatcacg

pepA-LowLIC: agagcaagccgaggttaggcctggggagccgaagccaaga,

и клонирования полученного ПЦР-продукта в вектор pXEGuniversal, обеспечивающий экспрессию целевого гена ПЕЛ за счет стабильной интегративной встройки гена в хромосому гриба *P. canescens*. Клонирование гена ПЕЛ осуществляли с применением метода независимого лигирования, описанного в работе [5], и примененного ранее для штамма гриба *P. verruculosum* [6] и *Aspergillus awamori* [7]. Все стандартные процедуры с ДНК, а именно: выделение геномной ДНК, выделение ПЦР-продуктов из агарозного геля, а также выделение плазмидной ДНК осуществляли с помощью наборов фирмы “QIAGEN” (США) по методикам фирмы-производителя. ПЦР проводилась на приборе MyCycler (“BioRad”, США) по следующей схеме: 95°C 5 мин – 1 цикл; 95°C 1 мин 30 с, 55°C 1 мин, 68°C 1 мин 30 с – 20 циклов; 68°C 10 мин, 4°C 30 мин.

Таким образом, в результате клонирования была получена плазмида pPelA (рис. 1), экспрессионная кассета которой состояла из гомологичного промотора и терминатора гена ксиланазы (КСИЛ) гриба *P. canescens*, гомологичного нуклеотидой последовательности, кодирующей сигнальный пептид β-галактозидазы (bgaS SS) и нуклеотидной последовательности гена зрелого белка ПЕЛ *P. canescens*.

Трансформация грибного штамма *P. canescens* RN_niaD⁽⁻⁾ и селекция трансформантов. Для получения трансформантов с целевыми активностями в качестве реципиента использовали штамм *P. canescens* RN_niaD⁽⁻⁾. Штамм-реципиент был трансформирован плазмидами pPelA, pβGlu и pEGII по методике, описанной ранее [8].

Отбор трансформантов, секретирующих ЭГП, БГЛ и ПЕЛ, проводили в иммунологических 96-луночных планшетах. Трансформанты, выросшие на селективной минимальной среде, отдельно пересевались в лунки планшета с 600 мкл среды, содержащей (г/л): соевая шелуха – 45.0, кукурузный экстракт – 50.0 и КН₂РО₄ – 25.0. Через 144 ч выращивания при 220 об/мин и 30°C из каждой лунки отбирали аликвоты культуральной жидкости (КЖ) и проводили электрофорез образцов в ПААГ в присутствии Na-ДДС, а также определяли удельные активности секретируемых ферментов.

Ферментные препараты. В работе использовали полученные ранее препараты ЭГП *P. verruculosum*, БГЛ *A. niger* и ПЕЛ *P. canescens* [9, 10], а также ФП

исходного штамма *P. canescens* RN_niaD⁽⁻⁾. Другие использованные в исследованиях ФП были получены путем лиофильного высушивания КЖ новых штаммов-продуцентов или КЖ после совместного культивирования полученных ранее штаммов – (моно)продуцентов. Культивирование штаммов проводили в 3 л ферментерах, используя среду, следующего состава (%): соевая шелуха – 4.5, кукурузный экстракт – 5.0 и КН₂РО₄ – 2.5. Ферментацию проводили в течение 120 ч при 30°C и pH 4.5.

Электрофорез белков. Электрофорез образцов КЖ и растворов ФП проводили в 12%-ном ПААГ в присутствии Na-ДДС с использованием электрофоретической ячейки Mini Protean (“BioRad”, США). Образцы растворов ФП, содержащие 30 мкг белка, инкубировали 15–20 мин при 100°C в присутствии 1.0% Na-ДДС и 5.0% β-меркаптоэтанола. Для определения молекулярной массы белков в исследуемых образцах использовали белковые маркеры с молекулярной массой в пределах 14.4–116 кДа (“Fermentas”, Литва). Белковые полосы окрашивали с использованием ку-масси бриллиантового синего G-250 (“Ferak”, Германия).

Субстраты. Для определения ферментативных активностей использовали следующие субстраты: цитрусовый пектин со степенью этерификации ~70%, Na-соль КМЦ, березовый ксилан и п-нитрофенил-β-D-глюкопиранозид (ПНФГ) производства “SIGMA” (США).

Коммерчески доступный сухой гранулированный жом был измельчен на мельнице, позволяющей получать частицы размером 1.5–2 мм, а затем в ножевой мельнице мелкого помола MF10 basic (“IKA Werke”, Германия) до частиц размером 0.5–1.0 мм.

Определение ферментативных активностей. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое в оптимальных условиях образует 1 мкмоль продукта за 1 мин.

Активность пектинлиазы определяли, регистрируя начальную скорость накопления ненасыщенных продуктов деструкции цитрусового пектина при 232 нм с коэффициентом поглощения 5500 М⁻¹ см⁻¹. Реакцию проводили в термостатируемой кювете при 40°C и pH 5.0 (50 мМ ацетатный буфер), концентрация пектина в реакционной смеси составляла 2.4 г/л [10].

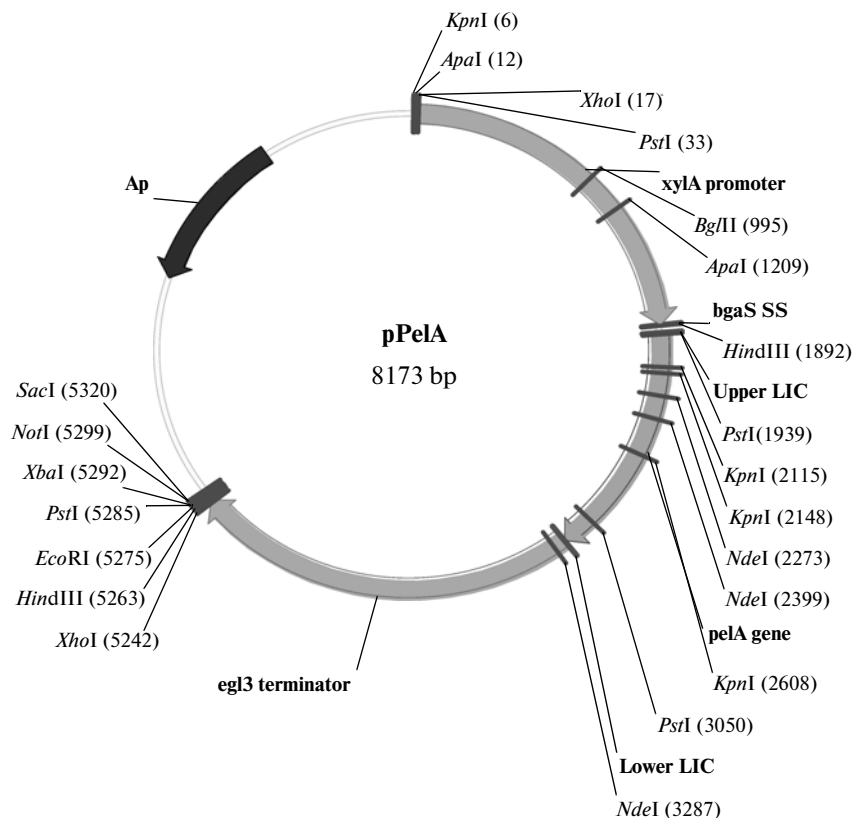


Рис. 1. Схема плазмиды pPelA, несущей ген гомологичной ПЕЛ *P. canescens*.

Активность эндо-1,4-β-глюканазы определяли по скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС) при гидролизе КМЦ (5.0 г/л) при 50°C и pH 5.0 (0.1 М ацетатный буфер), время гидролиза – 5 мин. Концентрацию ВС определяли методом Шомоди–Нельсона [11].

Активность ксиланазы определяли по скорости образования ВС при гидролизе березового ксилана (5.0 г/л) при 50°C и pH 5.0 (0.1 М ацетатный буфер), время гидролиза – 10 мин [11].

Активность β-глюкозидазы определяли по количеству п-нитрофенола, образующегося в результате гидролиза ПНФГ [11].

Определение концентрации белка. Содержание белка в ФП, а также концентрацию белка в образцах культуральной жидкости или хроматографических фракций определяли методом Лоури.

Гидролиз свекловичного жома. Эксперимент проводили в пластиковых емкостях объемом 60 мл. Реакционная смесь содержала: измельченный свекловичный жом – 100 г/л (в пересчете на сухие вещества), 2.0 или 10 мг белка соответствующего ФП на 1.0 г сухих веществ свекловичного жома, 0.1 М ацетатный буфер, pH 5.0, а также антибактериальные агенты, предотвращающие брожение (0.001 М азид натрия и ампицилин с конечной концентрацией 0.1 г/л). Объем реакционной

смеси составлял 20 мл. Емкости с реакционной смесью инкубировали в термошейкере INNOVA 40 (“New Brunswick Scientific”, США) при 50°C и 250 об/мин в течение 24 ч. По истечении указанного времени из реакционной смеси отбирали 600 мкл гидролизата, центрифугировали в течение 10 мин при 8765 g и измеряли концентрацию ВС в супернатанте методом Шомоди–Нельсона.

Анализ состава ферментных препаратов. Предварительную очистку ФП проводили путем осаждения белков сульфатом аммония (80% от насыщения) с последующим центрифугированием и перерастворением в 20 мМ буфере Bis-Tris/HCl, pH 6.8. Затем раствор ФП обессоливали на колонке с носителем Биогель-Р4 (“BioRad”, США). Последующие стадии разделения проводили с использованием жидкостного хроматографа среднего давления FPLC (“Pharmacia”, Швеция). Обессоленный раствор ФП подвергали анионообменной хроматографии на колонке Source 15 Q (“Pharmacia”, Швеция), нанесение образца проводили в 20 мМ буфере Bis-Tris/HCl, pH 6.8. Элюирование связавшихся белков проводили в градиенте концентрации NaCl от 0 до 0.4 М. Последующее разделение несвязавшейся фракции, а также негомогенных фракций, в составе которых присутствовали целевые белки, проводили с помо-

Таблица 1. Активности ферментов (ед./мл) в КЖ исходного штамма *P. canescens* (RN_niaD⁽⁻⁾) и полученных штаммов-продуцентов (С3, С5, D3 и С9)

Препарат	БГЛ	ЭГП	ПЕЛ
RN_niaD ⁽⁻⁾	5.8 ± 0.9	17.5 ± 2.6	0
С3	34.9 ± 5.2	55.5 ± 8.3	6.5 ± 1.0
С5	31.9 ± 4.8	61.1 ± 9.1	26.6 ± 4.0
D3	67.3 ± 10.1	98.1 ± 14.7	6.5 ± 0.8
С9	57.6 ± 8.6	85.9 ± 12.9	10.3 ± 1.5

щью гидрофобной хроматографии на колонке Source 15 ISO (“Pharmacia”, Швеция) в градиенте концентрации сульфата аммония от 1.7 до 0 М (50 мМ ацетатный буфер, рН 5.0). В полученных фракциях определяли концентрацию белка и активность по отношению к цитрусовому пектину, КМЦ, ксилану и ПНФГ. На основании полученных данных рассчитывали компонентный состав исследуемого ФП.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение ФП на основе нового штамма-продуцента. Реципиентный штамм *P. canescens* RN_niaD⁽⁻⁾ был котрансформирован 10 мкг смеси трех целевых плазмид pPelA, pβGlu и pEGII, взятых в равных соотношениях по 3.3 мкг ДНК. В результате было получено 82 трансформанта, что соответствует литературным данным о частоте трансформации штамма *P. canescens* [8].

Первичное исследование КЖ рекомбинантных штаммов показало, что количество трансформантов, обладающих тремя, двумя или одной активностью составляет 12, 21 и 24% от общего количества трансформантов соответственно.

Трансформанты С3, С5, D3 и С9, обладающие всеми целевыми активностями, культивировали в колбах на среде с соевой шелухой, в полученной КЖ определяли активности ферментов (табл. 1). Трансформант С9, обладавший максимальной активностью 3 ферментов, был отобран для культивирования в ферментерах с целью получения и изучения комплексного ФП на его основе.

Свойства ферментных препаратов. На рис. 2 приведена электрофореграмма образцов всех исследуемых ФП. Препараты БГЛ, ЭГП и ПЕЛ, полученные на основе штаммов-продуцентов БГЛ (117 кДа), ЭГП (39 кДа) и ПЕЛ (38 кДа) сильно отличались от ФП исходного штамма (RN_niaD⁽⁻⁾) и имели в основном одну активность.

ФП, полученный на основе созданного штамма-продуцента С9, содержал 3 целевых фермента, что подтвердили данные по удельной активности (табл. 2) и электрофореграмма (рис. 2). Отметим, что полоса ~40 кДа соответствовала ЭГП и ПЕЛ, молекулярные массы которых были близки. ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ, полученный путем высушивания КЖ при совместном культивировании штаммов – (моно)продуцентов, также содержал 3 активности (рис. 2). Удельная активность ЭГП в ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ была в 1.5 раза выше по сравнению с ФП С9, а удельная активность β-глюкозидазы – в 4 раза. Напротив, удельная активность пектинлиазы в ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ была в 2 раза ниже по сравнению с ФП С9 (табл. 2).

Необходимо отметить уменьшение удельной ксиланазной активности в полученных рекомбинантных ФП. Это, по-видимому, обусловлено процессом “титровки промотора”, связанного с замещением гена КСИЛ генами ПЕЛ, БГЛ и ЭГП в результате задействования гомологичных регуляторных элементов в процессе гомологичной рекомбинации [2]. Наиболее заметное падение ксиланазной активности наблюдалось в ФП БГЛ,

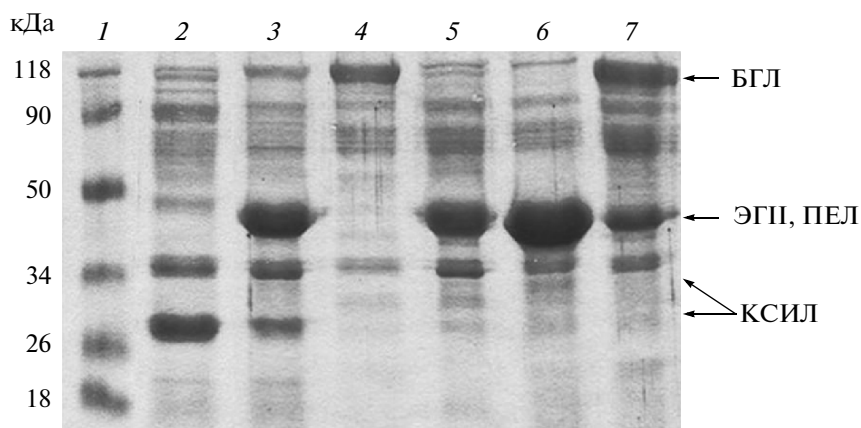


Рис. 2. ДДС-электрофорез ФП: 1 – белковый маркер, 2 – ФП исходного штамма *P. canescens* RN_niaD⁽⁻⁾, 3 – ФП штамма-продуцента С9, 4 – ФП БГЛ, 5 – ФП ЭГП, 6 – ФП ПЕЛ, 7 – ФП, полученный в результате совместного культивирования штаммов – (моно)продуцентов (БГЛ_ЭГП_ПЕЛ).

Таблица 2. Активности (ед./мг белка) исследуемых ФП

Препарат	БГЛ	ЭГП	КСИЛ	ПЕЛ
RN_niaD ⁽⁻⁾	0.1 ± 0.03	1.3 ± 0.08	101.0 ± 5.05	0
С9	2.1 ± 0.11	12.2 ± 0.61	30.1 ± 1.50	5.7 ± 0.29
БГЛ	5.8 ± 0.29	0.6 ± 0.31	2.6 ± 0.13	0
ЭГП	0.1 ± 0.01	7.3 ± 0.37	5.8 ± 0.29	0
ПЕЛ	0.2 ± 0.03	0.8 ± 0.04	6.5 ± 0.33	30.6 ± 1.53
БГЛ_ЭГП_ПЕЛ	7.8 ± 0.39	19.2 ± 0.96	12.3 ± 0.62	2.6 ± 0.13

ЭГП и ПЕЛ (табл. 2). ФП С9 обладал в 3 раза большей по сравнению с ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ удельной активностью ксиланазы, однако относительно ФП, полученного с помощью исходного штамма RN_niaD⁽⁻⁾, ксиланазная активность ФП С9 была снижена в 3 раза.

Сравнение ферментных препаратов по эффективности осахаривания свекловичного жома. Эффективность осахаривания свекловичного жома оценивали по концентрации ВС в реакционной смеси после 24 ч гидролиза, проведенного ФП при 50°C и pH 5.0.

На рис. 3 приведены результаты осахаривания при дозировке препарата 2 и 10 мг белка на 1 г сухих веществ свекловичного жома. Из рис. 3а видно, что при дозировке 2.0 мг/г выход ВС под действием ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ на 72% выше относительно выхода ВС для контрольного ФП RN_niaD⁽⁻⁾, полученного на основе исходного штамма *P. canescens* RN_niaD⁽⁻⁾, тогда как ФП С9 при дозировке 2.0 мг/г белка увеличивал выход ВС всего на 11% по сравнению с контрольным ФП RN_niaD⁽⁻⁾.

При дозировке 10 мг/г белка (рис. 3б) осахаривающая способность ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ и С9 также были выше по сравнению с ФП RN_niaD⁽⁻⁾ – на 43 и 18%, соответственно.

Полученные данные позволяют утверждать, что ФП, полученный при совместном культивировании штаммов – (моно)продуцентов БГЛ, ЭГП и ПЕЛ был наиболее эффективным среди исследуемых.

Состав исследуемых ФП. Нами были проанализированы составы ФП, полученных в результате совместного культивирования 3 штаммов (БГЛ_ЭГП_ПЕЛ), на основе штамма-продуцента 3 целевых ферментов (С9), а также исходного штамма (RN_niaD⁽⁻⁾). ФП фракционировали согласно описанной выше методике. В полученных фракциях, соответствующих БГЛ, ЭГП, ПЕЛ А и КСИЛ определяли концентрацию белка и активности по КМЦ, пектину ПНФГ и КСИЛ, далее, на основании данных об удельных активностях этих ферментов [10, 11–14], рассчитывали содержание указанных ферментов в составе соответ-

ствующих ФП. Установлено, что содержание КСИЛ и ПЕЛ в ФП С9 на 5.9% и 2.2% соответственно выше по сравнению с ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ (рис. 4), а содержание ЭГП и БГЛ напротив в ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ на 1.2% и 16.6% выше по сравнению с ФП С9. Содержание КСИЛ в ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ и С9 падало на 20.8% и 14.9% соответственно по сравнению с ФП RN_niaD⁽⁻⁾.

Сравнение данных о компонентном составе и осахаривающей способности исследованных препаратов позволило предположить, что более высокая эффективность осахаривания свекловичного жома ФП, полученным в результате совместного

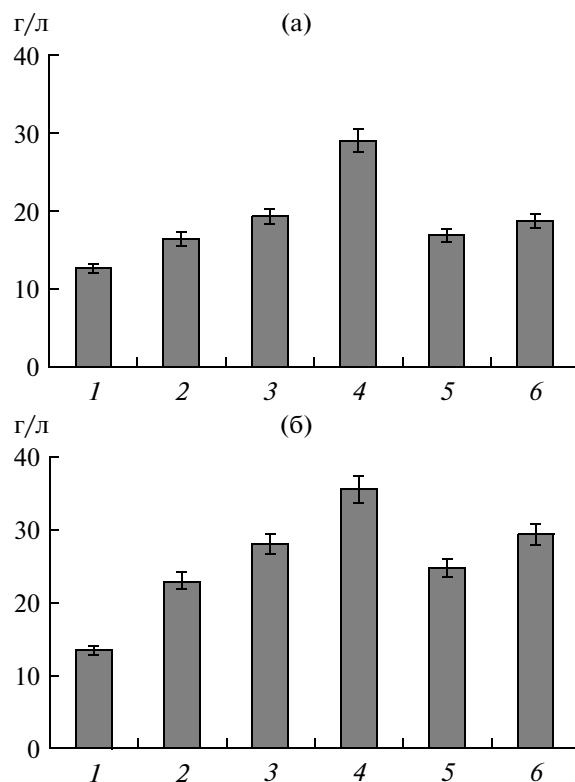


Рис. 3. Выход ВС после 24 ч гидролиза свекловичного жома при дозировке – 2 мг/г (а) и 10 мг/г (б). 1 – ФП БГЛ, 2 – ФП ЭГП, 3 – ФП ПЕЛ, 4 – ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ, 5 – ФП исходного штамма *P. canescens* RN_niaD⁽⁻⁾, 6 – ФП штамма-продуцента С9.

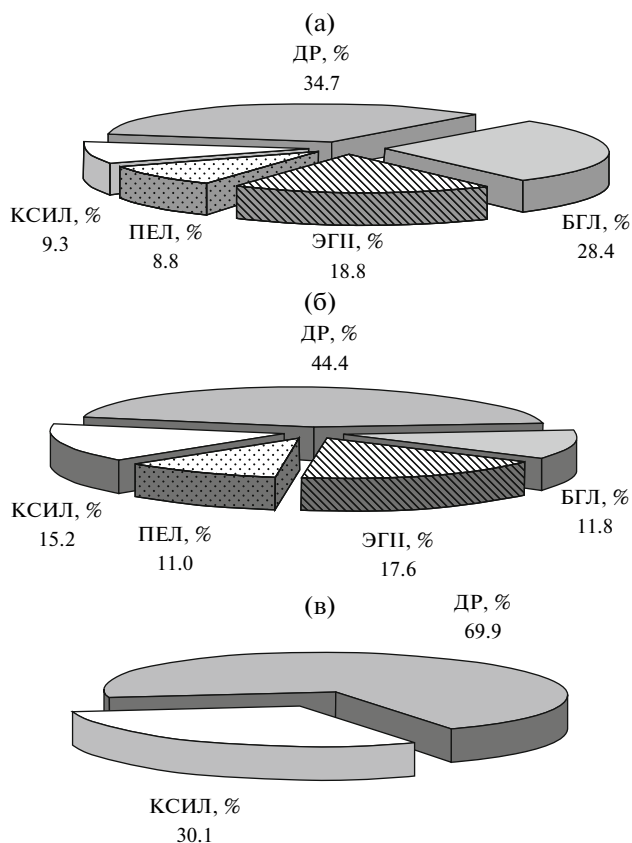


Рис. 4. Компонентный состав исследуемых ФП. а – ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ, полученный в результате совместного культивирования штаммов – (моно)продуцентов, б – ФП штамма-продуцента С9, в – ФП исходного штамма *P. canescens* RN_niaD. БГЛ – β -глюкозидаза, ЭГП – эндо-1,4- β -глюканаза, ПЕЛ – пектинлиаза А, КСИЛ – ксиланазы, ДР – другие белки.

культивирования штаммов – (моно)продуцентов (ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ), по сравнению с ФП на основе штамма С9 объясняется более высоким (на 18%) содержанием в первом целлюлолитических ферментов – ЭГП и БГЛ.

Таким образом, на основе рекомбинантных штаммов *P. canescens* PCA-RN_niaD⁽⁻⁾ были получены два ФП, обладающих активностью гомологичной ПЕЛ и гетерологичных ЭГП *P. verrucosum* и БГЛ *A. niger*. Показано, что ФП, полученный в результате совместного культивирования штаммов – (моно)продуцентов, секретирующих БГЛ, ЭГП и ПЕЛ, обладал большей эффективностью осахаривания свекловичного жома по сравнению с препаратом на основе штамма-продуцента 3 ферментов. Через 24 ч гидролиза свекловичного жома под действием ФП, полученного при совместном культивировании штаммов, выход ВС составил 35.6 г/л, что на 43% больше по сравнению с ФП, полученным с помощью исходного штамма *P. canescens* RN_niaD⁽⁻⁾ и на 21%

больше по сравнению с ФП созданного штамма-продуцента 3 ферментов.

Работа была выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (2009–2013 гг.), а также частичной поддержки из средств ГК № 12.741.11.0102.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кислухина О.В. Ферменты в производстве пищи и кормов. М: ДеЛипринт, 2002. С. 273.
2. Рожкова А.М., Волков П.В., Кондратьева Е.А., Сатрутдинов А.Д., Рубцова Е.А., Бушина Е.А., Зоров И.Н., Симицына О.А., Симицын А.П., Кошелев А.В., Беккаревич О.А., Бубнова Т.В., Окунев О.Н. // Хранение и переработка сельхозсырья. 2010. № 7. С. 37–39.
3. Волков П.В., Рожкова А.М., Правильников А.Г., Андрианов Р.М., Доценко Г.С., Беккаревич А.О., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Зоров И.Н., Симицын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 47. № 1. С. 66–73.
4. Вавилова Е.А. Винецкий Ю.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 2. С. 167–172.
5. Aslanidis C., de Jong P. // Nucleic. Acid Res. 1990. V. 18. P. 6069–6075.
6. Осипов Д.О., Рожкова А.М., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Рубцова Е.А., Правильников А.Г., Зоров И.Н., Симицына О.А., Овешников И.Н., Давидов Е.Р., Симицын А.П. // Катализ в промышленности. 2010. Т. 5. № 5. С. 64–71.
7. Рожкова А.М., Середа А.С., Цурикова Н.В., Нуртаева А.К., Семенова М.В., Римарева Л.В., Рубцова Е.А., Зоров И.Н., Симицына О.А., Симицын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 3. С. 308–317.
8. Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V., Clutterbuck A.J. // Curr. Genet. 1995. V. 28. P. 474–477.
9. Патент РФ. 2006. № 2288267.
10. Симицына О.А., Федорова Е.А., Семенова М.В., Гусаков А.В., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Чулкин А.М., Вавилова Е.А., Винецкий Ю.П., Симицын А.П. // Биохимия. 2007. Т. 72. № 5. С. 699–706.
11. Симицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов. Итоги науки и техники, Сер. “Биотехнология”. ВИНТИ. М., 1990. Т. 25. С. 30–37.
12. Скомаровский А.А., Марков А.В., Гусаков А.В., Кондратьева Е.Г., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Матыс В.Ю., Симицын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 6. С. 674–680.
13. Серебряный В.А., Симицына О.А., Фёдорова Е.А., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Соколова Л.М., Вавилова Е.А., Винецкий Ю.П., Симицын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 6. С. 665–673.
14. Короткова О.Г., Семенова М.В., Морозова В.В., Зоров И.Н., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Симицын А.П. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 5. С. 699–70.

Development of Complex Enzymatic Preparations of Pectinases and Celulases for Sugar Beet Marc Digestion

E. V. Bushina^a, A. M. Rozhkova^b, I. N. Zorov^b, A. D. Satrutdinov^b, A. O. Bekkarevich^c, A. V. Koshelev^c, O. N. Okunev^c, and A. P. Sinitsyn^a

^a Department of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
e-mail: info@rector.msu.ru

^b Bakh Research Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia
e-mail: inbi@inbi.ras.ru

^c Skryabin Research Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

Received November 8, 2011

Abstract—Complex enzymatic preparations demonstrating activities homologous to pectinlyase A and heterologous to endo-1,4- β -glucanase from *Penicilliumverruculosum* and β -glycosidase from *Aspergillusniger* have been obtained on the basis of recombinant strains of the fungus *Penicilliumcanescens*. Two approaches were utilized: development of an enzymatic preparation on the basis of a new strain, which produced all three enzymes, and development of an enzymatic preparation via combined cultivation of three strains, each of which produced one of the enzymes.