

УДК 606

Перспективы использования метилотрофных дрожжей для создания промышленных продуцентов кормовых ферментов (миниобзор)

© 2019 О. Е. МЕЛЬКИНА^{1,*}, С. П. СИНЕОКИЙ¹

¹ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика), Москва, 117545

*e-mail: oligamelkina@gmail.com

Поступила в редакцию 07.10.2019 г.

После доработки 15.10.2019 г.

Принята к публикации 25.10.2019 г.

В последние годы конкуренцию мицелиальным грибам в области производства кормовых ферментов стали составлять рекомбинантные дрожжевые продуценты. Это связано с тем, что в ходе интенсивного изучения генетического разнообразия выявлены гены кормовых ферментов, удельная активность которых многократно превышает таковую у ферментов мицелиальных грибов, причем идентифицированные гены гораздо эффективнее экспрессируются в дрожжевых экспрессионных системах, чем в мицелиальных грибах. В результате использования дрожжевых рекомбинантных продуцентов удалось расширить производство линейки промышленных ферментов при существенном снижении их себестоимости. К преимуществам использования дрожжевых продуцентов рекомбинантных ферментов относится возможность получения моноферментов, которые входят в состав различных ферментных комплексов, формируемых для разной кормовой базы. Наиболее привлекательным объектом для создания штаммов-продуцентов рекомбинантных белков являются метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris*.

Ключевые слова: кормовые ферменты, *Pichia pastoris*, фитаза, ксиланаза, бета-глюканаза, промотор АOX1

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-12-20

В современном мире производство кормовых ферментов – одна из отраслей биотехнологии. Ферменты являются эффективными катализаторами многих химических реакций, протекающих в пищеварительной системе сельскохозяйственных животных и обеспечивающих их здоровье и продуктивность.

Необходимость применения ферментов в кормопроизводстве связана с их способностью улучшать питательность кормов. Использование более дешевого альтернативного сырья расширяет рацион, снижает расходы и ведет к повышению рентабельности животноводческих хозяйств. Однако корма на основе более дешевого сырья содержат в большем количестве антипитательных факторов: некрахмалистых полисахаридов (НПС) и фитиновой кислоты (табл. 1).

Процентный состав универсальной кормовой смеси (подходит для крупного рогатого скота, свиней, гусей и уток) примерно такой: 8% пшеницы, 42% ячменя, 30% кукурузы и 20% овса. Введение ферментов в состав корма повышает его питательность, что ведет к сокращению расходов на единицу продукции и повышению рентабельности животноводческих хозяйств (в среднем экономический эффект составляет 5–20 \$ на 1 т комбикорма). Однако следует учитывать, что экономический эффект от применения ферментного препарата (ФП) на 1 т комбикорма должен быть выше себестоимости ФП. Именно поэтому перед производителями кормовых ферментов стоит задача снижения себестоимости ФП и повышения их эффективности для различных субстратов.

Список сокращений: КЖ – культуральная жидкость; НПС – некрахмалистые полисахариды; ФП – ферментный препарат.

Содержание (%) некрахмалистых полисахаридов и фитиновой кислоты в основных компонентах комбикормов [1–2]

The content of non-starchy polysaccharides and phytic acid in the basic components of animal feed

Компонент	Некрахмалистые полисахариды		Фитиновая кислота
	арабиноксиланы	β-глюканы	
Пшеница	5,5–9,5	0,2–1,5	0,21–0,27
Ячмень	5,7–7,0	1,5–10,7	0,21
Кукуруза	4,0–4,9	0,1–2,0	0,18–1,5
Овес	13,6	2,5	0,19–0,20
Рожь	8,7	2,2–2,8	0,19
Соя	0,8–3,6	0,3–2,3	0,5–1,8
Подсолнечный жмых	11,0	5,8	1,5–4,5
Пшеничные отруби	21,0–26,0	1,9–2,4	1,5–5,5
Соевый шрот	4,0	0,9–6,7	0,5–3,5

Себестоимость ФП, в первую очередь, определяется съемом фермента (в единицах активности) с единицы культуральной жидкости (КЖ). В связи с тем, что масса продуцируемых ферментов, секретируемых клетками микроорганизмов, объективно ограничена (80–100 г/л для мицелиальных грибов, 20–30 г/л для дрожжей), наибольшим резервом для повышения съема фермента является удельная активность экспрессируемых ферментов (число единиц активности на единицу массы фермента). Следовательно, для снижения себестоимости ФП необходимо получать ферменты с высокой удельной активностью.

Основное требование, предъявляемое к кормовым ФП, – сбалансированный состав целевых ферментов с максимальной удельной активностью (при заданных значениях температуры и pH), подобранный исходя из кормовой базы, причем с минимальным содержанием балластных ферментов.

Фитаза, ксиланаза и β-глюканаза – основные ферменты в кормовой отрасли

Ферменты, наиболее часто применяемые для составления рационов, – это фитаза, ксиланаза и β-глюканаза. Именно они занимают более 90% общего объема кормовых ферментов. Такое доминирование связано с доказанной эффективностью и экономической целесообразностью их использования в кормлении сельскохозяйственных животных и птицы.

Эндо-1,3(4)-β-глюканаза (ЕС 3.2.1.6) катализирует гидролиз внутренних связей 1→3 или 1→4 в β-D-глюканах, в которых остаток глюкозы с восстанавливающей группой, участвующей в гидролизуемой связи, несет заместитель при С-3. Эндо-1,4-β-ксиланаза (ЕС 3.2.1.8) катализирует неупорядоченный гидролиз гликозидных связей

между остатками D-ксилозы в основной цепи ксилана с образованием смеси ксилоолигосахаридов. Фитаза (ЕС 3.1.3.8) катализирует гидролиз фитиновой кислоты (или ее солей – фитатов) с высвобождением инозитола и остатков фосфорной кислоты.

На российском рынке кормовых ферментов широко представлена продукция ведущих мировых производителей, среди которых доминируют такие компании как Huvepharma, BASF, DSM/Novozymes, Adisseo, Alltech, Royal OY, DuPont (Danisco) и Whan Sunhy Biology. Значительный вклад в отрасль ферментного производства в России вносят такие предприятия, как «ПО Сиббиофарм», «АгроСистема» и «Агрофермент».

Анализ российского рынка ферментных кормовых препаратов аналитической компанией «Abercade» показал, что объем использования комбикормов, в состав которых включены ФП, в птицеводстве и свиноводстве составляет ~50%. Объем потребления кормовых ферментов на 1 т комбикорма оценивают как в единицах активности (ед), так и в объеме вносимых ФП. Расходы ФП на 1 т комбикорма обычно составляют: 10⁶ ед. фитазы, 2·10⁶ ед. ксиланазы, 0,3·10⁶ ед. β-глюканазы.

Одной из ключевых проблем отрасли производства кормовых ферментов в России является очень высокая импортозависимость. Так, по данным экспертов, доля зарубежной продукции на российском рынке приближается к 90%. По данным аналитической компании «VVS» за 2017 год объем ферментов, импортируемых в РФ для кормления животных, составил 4580,65 т на сумму 41,47 млн. долл. Основной объем импорта ФП приходится на компании: «Biovet» («Huvepharma») – 775,9 т препаратов линейки Хостазим; «DSM/Novozymes» – 664,7 т препаратов линейки

Ронозим и Роксазим; «BASF» – 492,7 т препаратов линейки Натугрейн и Натуфос; «Finnfeeds OY» – 485 т препаратов линейки Акстра и Авизим; «Alltech» – 266,8 т препаратов линейки Оллзайм.

В свете российской политики повышения продовольственной безопасности развитие отечественной ферментной промышленности является крайне актуальной задачей.

Традиционные продуценты – мицелиальные грибы

Используемые в промышленности штаммы-продуценты ксиланаз и β -глюканиз в основном принадлежат к микроскопическим грибам родов *Aspergillus*, *Humicola*, *Penicillium* и *Trichoderma* [3–6]. До недавнего времени в производстве препаратов фитазы также использовали грибные штаммы, принадлежащих к роду *Aspergillus* [7]. Это обстоятельство можно объяснить способностью грибных продуцентов секретировать целевой продукт в среду культивирования в больших количествах и с хорошей воспроизводимостью параметров ферментации. На основе нерекомбинантных штаммов, продуктивность которых была усилена путем направленного мутагенеза [8–10], позднее появились грибные промышленные продуценты для различных ФП, таких как Оллзайм PT, BG и SSF (Alltech Inc., Великобритания), Хостазим X 500 (Biovet, Болгария), Натугрейн и Натуфос (BASF, Германия), Ронозим VP (CT) (Novozymes, Дания) и NP (Novozymes), Авизим 1202 (Danisco, Дания), Ровабио® Эксель AP (Adisseo, Франция). Преимущественное использование в промышленности именно нерекомбинантных грибных штаммов объяснялось тем, что в них эффективно экспрессируются только ферменты из родственных видов.

Помимо очевидных достоинств, грибные продуценты имеют существенные недостатки: секретирование целого ряда дополнительных «балластных» ферментов (пектиназ, протеаз, целлюлаз и др.); трудность балансировки соотношения ферментов в мультиэнзимных кормовых добавках для различных вариантов комбикормов; относительно низкие уровни специфической активности – около 100–120 ед/мг белка [11]; проблемы с эффективностью экспрессии гетерологичных генов.

Появление рекомбинантных грибных продуцентов, содержащих гены из родственных видов, позволило повысить удельную активность экспрессируемого фермента. Примерами ФП, полученными на подобных штаммах-продуцентах, могут служить Ронозим WX и Ронозим NP (DSM, Нидерланды) [12, 13], Натугрейн Wheat TS (BASF, Германия) [14] и Xylanase G/L (Danisco, Дания) [15].

В природе известны микроорганизмы, секретирующие ферменты с более высокой удельной активностью, чем таковые в грибных продуцентах. В табл. 2 [16] и табл. 3 [17–26] приведены данные по удельной активности и свойствам фитаз и ксиланаз из различных микроорганизмов. На примере фитазы видно, что, с точки зрения удельной активности, наиболее привлекательны бактериальные фитазы семейства кислых гистициновых фосфатаз. Как уже было отмечено, грибные штаммы малопригодны для экспрессии ферментов из таксономически далеких организмов, поэтому выбор системы для эффективной экспрессии генов ферментов с высокой активностью – важнейшая задача, которую необходимо учитывать при создании высокопродуктивного штамма.

Производители ФП по-разному решают эту задачу. В компании АВ Vista (Великобритания) экспрессировали модифицированный вариант фитазы *Escherichia coli* в штамме гриба *Trichoderma reesei* [27] и выпустили серию препаратов Квантум блю. В 2015 г. была представлена новая разработка концерна DuPont (США) Акстра™ РНУ – продукт на основе фитазы *Buttiauxella* spp. [28, 29], также продуцируемой *T. reesei*.

Однако проблема секретирования ряда «балластных» ферментов в этом случае остается нерешенной. Для производителей комбикормов важно иметь сбалансированный состав целевых ферментов с высокой активностью, который подбирают, исходя из кормовой базы и минимального содержания балластных ферментов. В связи с этим остается актуальной задача получения высокопродуктивных продуцентов моноферментов, способных эффективно экспрессировать гетерологичные гены ферментов, обладающих высокой удельной активностью.

Метилотрофные дрожжи как продуценты кормовых ферментов

Дрожжи *Pichia pastoris* способны накапливать рекомбинантный белок в среде культивирования в концентрации около 12 г/л [30], при этом примесь собственных секретлируемых белков оказывается весьма незначительной. В литературе имеются сведения об эффективной экспрессии в *P. pastoris* генов из различных организмов – от бактерий до млекопитающих [31–34]. Использование этой экспрессионной системы позволяет проводить широкомасштабный поиск гетерологичных ферментов с высокой удельной активностью и необходимыми технологическими характеристиками.

Многим исследователям удалось получить в дрожжах *P. pastoris* эффективную экспрессию генов ксиланаз, фитаз и β -глюканиз из различных источников [35–48] (табл. 4). На основании этих

Сравнение микробных фитаз из различных источников

Comparison of microbial phytases from different sources

Продуцент	Фитазная активность при 37 °С, ед/мг	pH*	T, °С*
Грибы			
<i>Aspergillus fumigatus</i> 6,0	23–28	5,0–6,0	60
<i>Aspergillus oryzae</i>	11	5,5	50
<i>Aspergillus terreus</i>	142–196	5,0–5,5	70
<i>Aspergillus niger</i> 5,5	50–103	2,2	55–58
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	110	6,0	65
<i>Peniphora lycii</i>	1080	5,5	58
Дрожжи			
<i>Candida krusei</i>	1210	4,6	40
<i>Cladosporium</i>	909	3,5	40
Бактерии			
<i>Escherichia coli</i>	811–1800	4,5	55–60
<i>Klebsiella terrigena</i>	205	5,0	58
<i>Bacillus subtilis</i>	9–15	6,5–7,5	55–60
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	20	7,0–8,0	70
<i>Citrobacter braakii</i>	3457	4,0	50
<i>Pseudomonas syringae</i>	769	5,5	40

*Здесь и далее указаны оптимальные значения температуры и pH.

*Here in after, the optimum temperature and pH are indicated.

Сравнение микробных ксиланаз из различных источников

Comparison of microbial xylanases from different sources

Продуцент	Ксиланазная активность, ед/мг	pH	T, °С	Литературный источник
<i>Aspergillus aculeatus</i>	30	4,5	40	[17]
<i>Trichoderma reesei</i>	1300	4,0–5,5	40–45	[18]
<i>Trichoderma viride</i>	230	5,0	53	[4]
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	552	6–6,5	70	[19]
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	100	5,0–6,0	45	[4]
<i>Bacillus subtilis</i>	1200	6,8–7,0	40	[20]
<i>Neocallimastix patriciarum</i>	900	6,0	50	[21]
<i>Bacillus brevis</i>	4380	7,0	55	[22]
<i>Bacillus pumilus</i> SV-205	7382	6,0	60	[23]
<i>Paenibacillus sp.</i> NF1	3081	6,0	60	[24]
<i>Paenibacillus macerans</i> ПPSP3	4170	4,5	60	[25]
<i>Providencia sp.</i> strain XI	36,3	9,0	60	[26]

данных, можно заключить, при экспрессии целевого гена под контролем сильного индуцибельного промотора АОХ1 можно наработать белковый продукт за небольшой промежуток времени. Кроме того, делеция гена *aox1* в клетках *P. pastoris* позволяет существенно увеличить продукцию целевого белка [49].

Для улучшения экспрессии гетерологичных белков в *Pichia pastoris* используют следующие подходы:

– получение синтетических последовательностей генов, кодирующих целевой фермент, с оптимизированным составом кодонов [50];

– увеличение копийности гена, кодирующего целевой фермент, в хромосоме штамма-хозяина с помощью системы Cre-lox [51];

– интеграция в хромосому *P. pastoris* экспрессионных кассет, содержащих гены системы UPR (unfolded protein response), ответа клетки на несвернутый белок [52].

Уровни экспрессии ферментов в *Pichia pastoris* под контролем метанол-индуцибельного промотора АОХ1
 Expression levels of enzymes under the AOX1 methanol-inducible promoter in *Pichia pastoris*

Источник гена	Уровень экспрессии, ед/мл	Удельная активность, ед/мг	Литературный источник
Фитаза			
<i>Citrobacter freundii</i>	193	2072	[35]
<i>Peniophora lycii</i>	10540	864	[36]
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	15000	3548	[37]
Эндо-1,4-β-ксилаза			
<i>Aspergillus niger</i> IA-001	10035	1916	[38]
<i>Aspergillus usamii</i>	33500	–	[39]
<i>Trichoderma reesei</i>	261	746	[40]
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	156-360	–	[41]
<i>Rhodothermus marinus</i>	3130	–	[42]
<i>Bacillus licheniformis</i>	163,5	122,9	[43]
<i>Bacillus pumilus</i> HBP8	644	–	[44]
Эндо-1,3(4)-β-глюканаза			
<i>Paecilomyces thermophila</i>	61754	–	[45]
<i>Bispora</i> sp.	1000	4040	[46]
<i>Humicola insolens</i>	44,5	693	[47]
<i>Coprinosia cinerea</i>	9,27	118,8	[48]

С использованием индуцибельной экспрессионной системы дрожжей *P. pastoris* создан ряд ФП: Хостазим Р и ОптиФос® (Huvepharma, Болгария), Кингфос, Мегаксилан, Мегафос и Мегаклюкан производства Weifang KDN Biotech Co. (Китай).

В табл. 5 приведены данные по стоимости наиболее распространенных ФП в расчете на 1 т комбикорма. Как видно, ФП, полученные на рекомбинантных штаммах грибов, имеют более высокую стоимость дозирования, чем ФП, полученные на экспрессионной системе *P. pastoris*. Таким образом, эффективная экспрессия в *P. pastoris* гетерологичных генов, кодирующих ферменты с высокой удельной активностью, позволила производителям существенно снизить себестоимость ФП.

Еще одно преимущество *P. pastoris* перед грибными продуцентами состоит в том, что технология культивирования штаммов *P. pastoris* во многом универсальна, и производственные мощности, рассчитанные на получение одного рекомбинантного фермента, также могут быть использованы для получения других ферментов. Это позволяет производителю гибко реагировать на изменения спроса, регулируя ассортимент в пользу тех или иных ферментов без дополнительных капиталовложений.

Одним из главных компонентов при разработке технологий по созданию современных ферментных препаратов являются промышленные рекомбинантные продуценты нового поколения, синтезирующие ферменты с необходимыми свойствами и в количествах, обеспечивающих конкурентоспособность производства.

В мицелиальных грибах, используемых в качестве штаммов-продуцентов кормовых ферментов, содержание целевого белка в КЖ достигает 80–100 г/л, тогда как в дрожжах – только 20–25 г/л. Однако относительно низкая удельная активность ферментов, ограниченное разнообразие экспрессируемых гетерологичных генов, синтез дополнительных «балластных» ферментов и наличие спор – все эти недостатки приводят к снижению интереса к мицелиальным грибам как продуцентам кормовых ферментов.

Все большее внимание исследователей и производителей ФП фокусируется на метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris*. Эти клетки эффективно экспрессируют гетерологичные гены, кодирующие ферменты с высокой удельной активностью. Для них разработана удобная индуцибельная система экспрессии под контролем промотора АОХ1. Возможен синтез моноферментов.

Ферментные препараты, содержащие ксиланазу, фитазу или β-глюканазу, представленные на российском рынке

Available enzymatic products containing xylanase, phytase or β-glucanase on the Russian market

Препарат	Фирма, страна-производитель	Состав	Донор гена	Продуцент	Стоимость дозировки, руб.
Грибные нерекомбинантные штаммы-продуценты					
Оллзайм РТ	Alltech Inc., Великобритания	Эндо-1,4-β-ксилаза (600)	–	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	284
Ронозим VP (СТ)	Novozymes, Дания	β-глюканаза (50)	–	<i>Aspergillus aculeatus</i>	237
Оллзайм ВG	Alltech Inc., Великобритания	β-глюканаза (300)	–	<i>T. viride</i> CBS 517.94	270
Авизим 1202	Danisco, Великобритания	β-глюканаза (200) и др.	–	<i>T. longibrachiatum</i>	204
Ровабио® Эксель AP	Adisseo, Франция	β-глюканаза (2000) и др.	–	<i>Penicillium funiculosum</i>	135
Натүфос 5000 G	BASF, Германия	Фитаза (5000)	–	<i>A. niger</i> NPH54	106
Оллзайм SSF	Alltech, Inc., США	Фитаза (300)	–	<i>A. niger</i>	218
Хостазим X 50	Biovet AD, Болгария	Эндо-1,4-β-ксилаза (30000)	–	<i>T. reesei</i>	108
Рекомбинантные грибные штаммы-продуценты					
Ронозим NP (СТ)	Novozymes, Дания	Фитаза (10000)	<i>Peniophora lycii</i>	<i>A. oryzae</i>	90
Натүгрейн TS	BASF, Германия	Эндо-1,4-β-ксилаза (950) и др.	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>A. niger</i> CBS 109.713	55
Ронозим ХайФос	Novozymes, Дания	Фитаза (10000)	<i>Talaromyces emersonii</i>	<i>A. oryzae</i>	50
Акстра™ РНУ 10000 ТРТ2	Finnfeeds OY, Финляндия	Фитаза (10000)	<i>Citrobacter braakii</i>	<i>T. reesei</i>	65
Квантум Блю 5G	ROAL OY, Финляндия	Фитаза (5000)	<i>Escherichia coli</i>	<i>T. reesei</i> CBS 126897	48
Ронозим WX	Novozymes, Дания	Эндо-1,4-β-ксилаза (1000)	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>A. oryzae</i> DSM 10287	76
Рекомбинантные штаммы-продуценты <i>Pichia pastoris</i>					
Кингфос	Weifang KDN Biotech Co., Китай	Фитаза (5000)	<i>E. coli</i>	<i>P. pastoris</i>	18,5
ОптиФос® 16000 PF	Biovet AD, Болгария	Фитаза (16000)	То же	<i>P. pastoris</i> DSM 23036	16,5
Мегаглюкан HC 20 000 TC	Weifang KDN Biotech Co., Китай	β-глюканаза (50000)	–	<i>P. pastoris</i>	23,8
Мегаксиан HC	Weifang KDN Biotech Co., Китай	Эндо-1,4-β-ксилаза (200000)	–	То же	27,4
Мегафос HC	Weifang KDN Biotech Co., Китай	Фитаза (10000)	–	» »	20,2

Примечание: в скобках указана активность, ед/г; стоимость дозировки указана на 1 т комбикорма, исходя из цены на ФП; цены актуальны на III квартал 2019 г. (<https://agroserver.ru>; <http://www.tandem-industry.ru>). «–» – нет данных.

Note: activity (units/g) is indicated in parentheses; dosage cost is indicated for 1 tonne of feed, based on the price of enzymatic product; prices are valid for the III quarter of 2019 (<https://agroserver.ru>; <http://www.tandem-industry.ru>). «–» – no data available.

Использование дрожжевых продуцентов рекомбинантных белков позволяет существенно снизить стоимость дозировки ФП за счет высокой удельной активности экспрессируемых ферментов, а оптимизация экспрессионной системы *P. pastoris* – получить высокопродуктивные штаммы и тем самым снизить себестоимость синтезируемых в них ФП.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (проект RFMEFI60717X0180) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

ЛИТЕРАТУРА

- Choct M. Enzymes for the feed industry: past, present and future. *World Poult. Sci. J.*, 2006, 62(1), 5–16.
- Egli I., Davidsson L., Juillerat M.A., et al. The influence of soaking and germination on the phytase activity and phytic acid content of grains and seeds potentially useful for complementary feeding. *J. Food Sci.*, 2002, 67(9), 3484–3488.
- Goswami G.K., Rawat S. Microbial xylanase and their applications: a review. *Int. J. Curr. Res. Aca. Rev.*, 2015, 3(6), 436–450.
- Butt M.S., Tahir-Nadeem M., Ahmad Z., et al. Xylanases in baking industry. *Food Technol. Biotechnol.*, 2008, 46(1) 22–31.
- Odeniyi O.A., Onilude A.A., Ayodele M.A., Characteristics of a β -1,4-D-endoglucanase from *Trichoderma virens* wholly applied in a palm-fruit husk-based diet for poultry layers. *Braz J Microbiol.*, 2012, 43(4):1467–1475.
- Sharma A., Nakas J.P., Preliminary characterization of laminarinase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Enzyme Microb. Technol.*, 1987, 9, 89–93.
- Lei X.G., Weaver J.D., Mullaney E., et al. Phytase, a new life for an “old” enzyme. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 2013, 1, 283–309.
- Окунев О.Н., Баккаревич А.О., Сеницын А.П., Черноглазов В.М. Штамм мицелиального гриба *Trichoderma longibrachiatum* - продуцент целлюлаз, бета-глюканаза и ксиланаза. Патент RU2303065, опубликован 20.07.2007 Бюл. №20
- Filipovic B., Pokorny M. Procedure for the production of beta glucanase from the mould *Mucor miehei* and beta glucanase gained by this procedure. Patent SI9110531A, Publ. 31.10.1997.
- Nissen B.A., Hovland J. Preparation of the enzyme β -glucanase by fermentation of fungi. Patent US4588690A, Publ. 13.05.1986.
- Wyss M., Brugger R., Kronenberger A., et al. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65, 367–373.
- Hansen P. K., Wagner P., Müllertz A., Knap I. H. Animal feed additives comprising xylanase. Patent WO1996023062A1, Publ. 01.08.1996.
- Matsui T., Fuglsang C.C., Svendsen A., Fukuyama S. Phytase variants. Patent EP2295553A1, Publ. 16.03.2011 Bull. 2011/11.
- Anadón A., Arzo M.A., Bories G., Brantom P., et al. Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the safety and efficacy of the enzymatic preparation Natugrain® Wheat TS. *EFSA J.*, 2007, 474, 1–11.
- Gravesen T.N., Derckx P.M.F. *Talaromyces emersonii* xylanase. Patent WO2001042433A3, Publ. 27.12.2001.
- Mittal A., Gupta V., Singh G., et al. Phytase: a boom in food industry. *Octa. J. Biosci.*, 2013, 1(2), 158–169.
- Rantanen H., Virkki L., Tuomainen P., et al. Preparation of arabinoxylobiose from rye xylan using family 10 *Aspergillus aculeatus* endo-1,4- β -D-xylanase. *Carbohydr. Polym.*, 2007, 68(2), 350–359.
- Tenkanen M., Puls J., Poutanen K. Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb. Technol.*, 1992, 14, 566–574.
- Khucharoenphaisan K., Tokuyama S., Kitpreechavanich V. Purification and characterization of a high-thermostable β -xylanase from newly isolated *Thermomyces lanuginosus* THKU-49. *Mycoscience*, 2010, 51(6), 405–410.
- Enzymes in Farm Animal Nutrition. Eds Bedford M.R., Partridge G.G., 2nd edn. UK: CAB International, 2010, 319 p.
- Dijkerman R., Ledebouer J., Camp H. D., et al. The anaerobic fungus *Neocallimastix sp.* strain L2: growth and production of (hemi)cellulolytic enzymes on a range of carbohydrate substrates. *Curr. Microbiol.*, 1997, 34, 91–96.
- Goswami G.K., Krishnamohan M., Nain V., et al. Cloning and heterologous expression of cellulose free thermostable xylanase from *Bacillus brevis*. *Springerplus*, 2014, 10, 3–20.
- Nagar S., Mittal A., Kumar D., et al. Production of alkali tolerant cellulase free xylanase in high levels by *Bacillus pumilus* SV-205. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2012, 50(2), 414–420.
- Zheng H.C., Sun M.Z., Meng L.C., et al. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Paenibacillus sp.* NF1 and its application in xylooligosaccharides production. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 24(4), 489–496.
- Dheeran P., Nandhagopal N., Kumar S., et al. A novel thermostable xylanase of *Paenibacillus macerans* IPSP3 isolated from the termite gut. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 39(6), 851–860.

26. Raj A., Kumar S., Singh S.K., et al. Characterization of a new *Providencia* sp. strain X1 producing multiple xylanases on wheat bran. *Sci. World J.*, 2013, 2013(4), 386769.
27. Wilkinson, S.J.; Walk, C.L.; Bedford, M.R., et al. Influence of conditioning temperature on the post-pelleting recovery and efficacy of 2 microbial phytases for broiler chicks. *J. Appl. Poultry Res.*, 2013, 22, 308–313.
28. Kensch O., Pellengahr K.S., Leuthner B., et al. *Buttiauxella* sp. phytase variants. Patent EP2283124B1, Publ. 25.05.2016.
29. Aquilina G., Bampidis V. Scientific opinion on the safety and efficacy of Axta PHY 15000 L (6-phytase) as a feed additive for poultry and porcine species. *EFSA J.*, 2015, 13, 4275.
30. Clare J.J., Rayment F.B., Ballantine S.P., et al. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology*, 1991, 9, 455–460.
31. Romanos M.A., Clare J.J., Beesley K.M., et al. Recombinant *Bordetella pertussis* pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high-level production and immunological properties. *Vaccine*, 1991, 9, 901–906.
32. Choi B.-K., Jimenez-Flores R. Study of putative glycosylation site in bovine beta-casein introduced by PCR-based site-directed mutagenesis. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, 358–364.
33. Canales M., Enriquez A., Ramos E., et al. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac against cattle tick. *Vaccine*, 1997, 15, 414–422.
34. Rogelj B., Strukelj B., Bosch D., et al. Expression, purification and characterization of equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, 2000, 19, 329–334.
35. Zhao W., Xiong A., Fu X., et al. High level expression of an acid-stable phytase from *Citrobacter freundii* in *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2010, 162, 2157–2165.
36. Xiong A.S., Yao Q.H., Peng R.H., et al. High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycii* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 2006, 72, 1039–1047.
37. Luo H., Huang H., Yang P., et al. A novel phytase *appa* from *Citrobacter amalonaticus* CGMCC 1696: gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*. *Curr. Microbiol.*, 2007, 55(3), 185–192.
38. Fang W., Gao H., Cao Y., et al. Cloning and expression of a xylanase *xynB* from *Aspergillus niger* IA-001 in *Pichia pastoris*. *J. Basic Microbiol.*, 2014, 54, 190–199.
39. Wang J., Li Y., Liu D. Improved production of *Aspergillus usarii* endo- β -1,4-xylanase in *Pichia pastoris* via combined strategies. *Biomed. Res. Int.*, 2016, 3265895.
40. He J., Yu B., Zhang K., et al. Expression of endo-1,4-beta-xylanase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and functional characterization of the produced enzyme. *BMC Biotechnol.*, 2009, 16, 9–56.
41. Damaso M.C., Almeida M.S., Kurtenbach E., et al. Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(10), 6064–6072.
42. Ramchuran S.O., Mateus B., Holst O., et al. The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* as a host for the expression and production of thermostable xylanase from the bacterium *Rhodothermus marinus*. *FEMS Yeast Res.*, 2005, 5(9), 839–850.
43. Liu MQ, Liu G. Expression of recombinant *Bacillus licheniformis* xylanase A in *Pichia pastoris* and xylooligosaccharides released from xylans by it. *Protein Expr. Purif.*, 2008, 57(2), 101–107.
44. Zhang G.-M., Hu Y., Zhuang Y.-G., et al. Molecular cloning and heterologous expression of an alkaline xylanase from *Bacillus pumilus* HBP8 in *Pichia pastoris*. *Biocatal. Biotransform.*, 2006, 24, 371–379.
45. Hua C., Yi H., Jiao L. Cloning and expression of the endo-1,3(4)- β -glucanase gene from *Paecilomyces* sp. FLH30 and characterization of the recombinant enzyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2011, 75(9), 1807–1812.
46. Luo H., Yang J., Yang P., et al. Gene cloning and expression of a new acidic family 7 endo-beta-1,3-1,4-glucanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 85(4), 1015–1023.
47. Li J., Xu X., Shi P., et al. Overexpression and characterization of a novel endo- β -1,3(4)-glucanase from thermophilic fungus *Humicola insolens* Y1. *Protein Expr. Purif.*, 2017, 138, 63–68.
48. Wang J, Kang L, Liu Z, et al. Gene cloning, heterologous expression and characterization of a *Coprinopsis cinerea* endo- β -1,3(4)-glucanase expressed in *Pichia pastoris*. *Fungal Biol.*, 2017, 121(1), 61–68.
49. Krainer F.W., Dietzsch C., Hajek T. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microb. Cell Fact.*, 2012, 11, 22.
50. Hatfield G.W., Roth D.A. Optimizing scaleup yield for protein production: Computationally Optimized DNA Assembly (CODA) and translation engineering. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 2007, 13, 27–42.
51. Gueldener U., Heinisch J., Koehler G.J., et al. A second set of *loxP* marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30(6), 2–8.
52. Цыганков М.А., Падкина М.В. Влияние сверхэкспрессии гена *PDI* на продукцию гетерологичных белков в дрожжах *Pichia pastoris*. *Экол. генет.*, 2017, 15(2), 21–30.

Prospects for the Use of Methylophilic Yeast in the Creation of Industrial Producers of Feed Enzymes

O. E. MEL'KINA^{1,*}, and S. P. SINEOKY¹

¹State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute» – GosNIIgenetika), Moscow, 1175454 Russia

*e-mail: oligamelkina@gmail.com

Received October 7, 2019

Revised October 15, 2019

Accepted October 25, 2019

Abstract—In recent years, mycelial fungi have faced competition from recombinant yeast producers in the production of feed enzymes. An intensive study on genetic diversity identified yeast genes encoding feed enzymes the specific activity of which is much higher than that in mycelial fungi. In addition, these genes were expressed in yeast much more efficiently than in mycelial fungi. The use of yeast recombinant producers allowed expanding the production of a line of industrial enzymes with a significant reduction in their cost. The advantages of yeast producers of recombinant enzymes include the possibility of obtain monoenzymes that are part of various enzyme complexes used for different purposes. *Pichia pastoris* methylophilic yeast is the most attractive subject for the creation of recombinant protein-producing strains.

Key words: feed enzymes, *Pichia pastoris*, phytase, xylanase, β -glucanase, AOX1 promoter

Acknowledgements—The work was carried out using the equipment of the Multipurpose Scientific Installation of «All-Russian Collection of Industrial Microorganisms» National Bio-Resource Center, NRC «Kurchatov Institute» – GosNIIgenetika

Funding—The work was funded by the Ministry of Education and Science of Russia (Project Unique Identifier RFMEFI60717X0180).

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-12-20