

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 573.6;577.151;579.66:663.15

Получение промышленно важных ферментов на основе экспрессионной системы гриба *Penicillium verruculosum*

© 2020 А.П. СИНИЦЫН^{1,2}, О.А. СИНИЦЫНА², А.М. РОЖКОВА^{1,2*}

¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, 119071

² Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

*e-mail: amrojko@yahoо.com

Поступила в редакцию 06.03.2020 г.

После доработки 23.04.2020 г.

Принята к публикации 01.12.2020 г.

В обзоре приведены данные по получению с помощью системы экспрессии низших грибов *Penicillium verruculosum* высокоактивных рекомбинантных штаммов — продуцентов широкого круга ферментов, используемых в различных областях промышленности и сельского хозяйства: эндоглюканаза, β -глюканаза, ксиланаза, маннаназа, фитаза, α -галактозидаза, пектинлиаза, полигалактуроназа, декстраназа, экзоинулиназа, хитиназа. Реципиентный штамм *P. verruculosum* В1-537 (*DniaD*) характеризуется высокой секреторной способностью (до 60 г/л внеклеточного белка в культуральной жидкости), а рекомбинантные штаммы-продуценты — высокой продуктивностью целевых ферментов; полученные с их помощью ферментные препараты содержат, как правило, 30–70% целевых рекомбинантных ферментов (в некоторых случаях — до 80%) от общего пула белка. Система экспрессии *P. verruculosum* позволяет легко трансформировать экспрессионные конструкции, содержащие целевые гетерологичные или гомологичные гены, функционально связанные с промотором и терминатором «сильного» индуцибельного промотора гена целлюбиогидролазы-1 (*cbh1*), причем генетическую трансформацию реципиентного штамма можно осуществлять одновременно несколькими векторными конструкциями. Встраивание целевых генов в хромосому реципиентного штамма — процесс интегративный; при этом кодируемые ими «чужеродные» рекомбинантные белки не подвержены протеолизу. Технология первичного отбора позитивных трансформантов на агаризованных средах, а также вторичного отбора при их культивировании в качалочных колбах и ферментерах проста и надежна в использовании — в том числе благодаря стандартизированным параметрам: состава питательной среды и условий культивирования рекомбинантных штаммов-продуцентов различных целевых ферментов. Затраты времени на получение продуцента целевого фермента — от постановки задачи до получения рекомбинантного штамма-продуцента — составляют от 3 до 6 месяцев. Важно подчеркнуть, что рекомбинантные штаммы *P. verruculosum* как продуценты различных целевых ферментов успешно используются в промышленном производстве.

Ключевые слова: экспрессионная система, клонирование, промышленные ферменты, кормовые добавки, *Penicillium verruculosum*

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-17-34

Список сокращений: АГЛС — α -галактозидаза С; ГРП — гидроразрыв пласта; ДЕК — декстраназа; ИНУ — экзоинулиназа; КЖ — культуральная жидкость; КМЦ — карбоксиметилцеллюлоза; КСИЛ — ксиланаза; ЛАМ — ламинариназа; МАН — маннаназа; МКЦ — микрокристаллическая целлюлоза; НПС — некрахмальные полисахариды; ПЕЛ — пектинлиаза; ПГ — полигалактуроназа; ПГК — полигалактуроновая кислота; ФИТА — фитаза А; ФП — ферментный препарат; ХИТ — хитиназа; ЦБГ — целлюбиогидролаза; ЭГ — эндоглюканаза.

Ферменты находят широкое применение в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства: для отбеливания и распуска целлюлозы, обработки тканей и текстильных изделий, в спиртовой промышленности, виноделии, пивоварении, в производстве, осветлении и стабилизации соков, при получении глюкозно-фруктозных сиропов, улучшении качества хлебобулочных изделий, в качестве кормовых добавок, при утилизации и переработке различных отходов.

Источником технических ферментов служат животные, растения и микроорганизмы различных таксономических групп — как прокариоты (грамотрицательные и грамположительные бактерии), так и эукариоты (дрожжи, грибы) [1]. К преимуществам микроорганизмов как продуцентов ферментов относится короткий цикл роста, относительно простой состав питательной среды, способность к биосинтезу как одного (преобладающего) фермента, так и мультиферментных систем, а также генетическая стабильность. Микроскопические грибы считаются наиболее перспективным источником технических ферментов — среди них можно найти продуценты практически всех необходимых для использования в промышленности или сельском хозяйстве.

Для реализации экономически оправданного производства ферментов важно иметь грибы-продуценты с высокой секреторной способностью. Для увеличения их продуктивности обычно применяют два основных подхода. Первый заключается в использовании различных видов мутагенеза и селекции (обычно проводят ряд последовательных стадий мутагенеза [2]). Второй основан на использовании методов генетической инженерии, которые позволяют быстро и эффективно модифицировать исходные высокоактивные штаммы-продуценты с целью получения целевых ферментов или ферментных комплексов. Манипуляции с ДНК клетки-хозяина или внесение в ДНК этой клетки экзогенного генетического материала дают возможность целенаправленно изменять как сами штаммы-продуценты, так и свойства белков «интереса» — например, увеличивать их стабильность и ферментативную активность.

В последние десятилетия был создан ряд грибных экспрессионных систем «хозяин-вектор» с высоким уровнем секреторной активности, что позволяет проводить биосинтез целевых ферментов или целых ферментных систем. Для этого используют грибы родов *Aspergillus* [3, 4], *Hypocrea* (ранее *Trichoderma*) [5, 6], *Humicola insolens* [7, 8], *Myceliophthora thermophyla* (ранее *Chrysosporium lucknowense*) [9] и *Penicillium canescens* [10].

С помощью ряда последовательных шагов неупорядоченного мутагенеза с последующей селекцией из дикого штамма *Penicillium verruculosum* WA30 нами был получен высокопродуктивный штамм *P. verruculosum* B221-151 [11], из которого далее, также путем мутагенеза, получили реципиентный штамм *P. verruculosum* B1-537 ($\Delta niaD$), сохранивший высокую секреторную способность предшественника (до 50–60 г/л внеклеточного белка). Этот штамм является ауксотрофом с дефектом в гене *niaD*, кодирующем нитратредуктазу, принимающую участие в ассимиляции нитратного азота, что используется в качестве селекционного признака при скрининге рекомбинантных штаммов.

Важной особенностью реципиентного штамма *P. verruculosum* B1-537 ($\Delta niaD$) является то, что он продуцирует комплекс внеклеточных целлюлаз, которые по своей гидролитической активности превосходят аналоги, получаемые при использовании штаммов рода *Hypocrea*, в том числе те, которые применяются в промышленном производстве ферментов [12]. Кроме того, в результате мутагенеза у штамма *P. verruculosum* B1-537 ($\Delta niaD$) снижена глюкозная катаболитная репрессия, что дает возможность культивировать его в питательной среде, содержащей глюкозу, а также в режиме, предусматривающем подпитку глюкозой. Биосинтез целлюлаз этого штамма индуцируется целлюлозой и целлоолигосахаридами.

Генетическая конструкция для обеспечения экспрессии целевых гомологичных и гетерологичных генов в клетках реципиентного штамма гриба *P. verruculosum* B1-537 ($\Delta niaD$), используемого в качестве хозяина, содержит целевую кодирующую последовательность, функционально связанную с регуляторными элементами гена *cbh1*, ответственного за синтез целлюлогидролазы-1 (ЦБГ1), — мажорного фермента, продуцируемого *P. verruculosum*. Эти элементы представляют собой промотор и терминатор гена *cbh1*, а сигнальный пептид зависит от выбора целевого белка [13].

В представленном обзоре проанализирована возможность использования экспрессионной системы *P. verruculosum* для получения промышленно важных ферментов.

Способ получения целевых ферментов (ферментных препаратов, ФП) складывается из нижеперечисленных этапов.

Этап 1. Конструирование экспрессионной плазмиды для трансформации клеток *P. verruculosum* B1-537 ($\Delta niaD$), в которой ген целевого фермента сопряжен с регуляторными последовательностями (промотор и терминатор) гена *cbh1*.

Содержание некрахмальных полисахаридов в кормовом сырье

Content of non-starch polysaccharides in feed stocks

Вид сырья	Некрахмальные полисахариды, %			
	Целлюлоза	β -глюканы	Ксиланы	Общее содержание
Пшеница	2,0–3,0	0,8–1,5	6,0–9,5	7,5–11,2
Рожь	2,1–2,5	0,5–2,5	7,6–9,0	11,0–13,0
Ячмень	3,9–9,0	4,3–10,0	5,5–7,0	13,0–16,5
Овес	8,0–12,3	3,0–6,6	5,5–6,9	15,0–25,0

Примечание: данные представлены в процентах (%) в пересчете на сухое вещество. Данные взяты из работы [19].

Note: data are presented as percent (%) calculated on dry matter [19].

Этап 2. Генетическая трансформация экспрессионной плазмидой с включенным целевым геном (или фрагментом ДНК в линейной форме) реципиентного штамма *P. verruculosum* В1-537 (*AniaD*) в условиях котрансформации с плазмидой (или фрагментом ДНК в линейной форме), несущей последовательность *niaD* гена, как маркера селекции; осуществление отбора трансформантов, секретирующих в культуральную жидкость (КЖ) целевой фермент, детектируемый по его активности. Проведение ферментаций отобранных трансформантов в качалочных колбах и выбор наиболее продуктивного варианта(ов) штамма-продуцента.

Этап 3. Проведение процесса ферментации отобранного наиболее активного варианта(ов) штамма-продуцента в ферментерах, получение ФП, обладающего активностью целевого фермента (или целевых ферментов); исследование свойств ФП (активность по отношению к различным субстратам, зависимость активности от pH и температуры, стабильность в различных условиях), определение качественного и количественного состава ФП с помощью методов высокоэффективного белкового фракционирования (анионообменная хроматографии с последующей гидрофобной хроматографией); выделение целевого рекомбинантного фермента (ферментов) в гомогенном состоянии и изучение их свойств; проведение испытаний рекомбинантного ФП и целевого рекомбинантного фермента (ферментов), направленных на исследование возможности применения в соответствующих областях промышленности и сельского хозяйства.

Состав питательной среды и условия культивирования в колбах и ферментерах для разных рекомбинантных штаммов — продуцентов различных целевых ферментов — остаются неизменными и не отличаются от таковых для реципиентного штамма. В качестве основных компонентов

в питательную среду входят микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) и глюкоза, в качестве источника азота используют соевую муку или мочевины. Условия проведения процесса ферментации в ферментерах стандартизированы с точки зрения требований по аэрации, pH, температуре и/или уровню пенообразования. Эти особенности позволяют быстро осуществить наработку значительных количеств опытных партий рекомбинантных ФП для изучения их свойств и прикладных испытаний, а также выделения значительного количества целевых рекомбинантных ферментов в гомогенном виде для исследования их свойств. Рекомбинантные внеклеточные целевые белки не подвержены протеолизу. Получаемые рекомбинантные штаммы стабильны и дают идентичные результаты по активности целевых ферментов в КЖ при многократных пересевах на агаризованную среду.

Ниже приведены примеры использования реципиентного штамма *P. verruculosum* В1-537 (*AniaD*) для получения промышленно важных ферментов.

Кормовые добавки

Нами, как это будет показано ниже, были получены [14–16] рекомбинантные штаммы *P. verruculosum* — продуценты ферментов, разрушающих некрахмальные полисахариды (НПС) зерна злаковых культур, широко используемых для производства кормов в животноводстве и птицеводстве (пшеница, рожь, овес, ячмень) [17]. Помимо питательных веществ (крахмал, белки) зерно злаковых содержит целлюлозу, β -глюканы и ксиланы (пентозаны), что становится причиной неполного усвоения кормов [18]. Содержание НПС в кормовом сырье варьирует в довольно широких пределах и может достигать 13–15% его массы (табл. 1) [19].

Отрицательное воздействие НПС на усвоение кормов обусловлено их набуханием и образованием гелеобразных субстанций, которые затрудняют доступ пищеварительных ферментов

Удельная активность лабораторных ферментных препаратов на различных субстратах

Specific activity of laboratory enzyme preparations toward to various substrates

Ферментный препарат	Субстраты, ед/мг белка*		
	КМЦ	Ксилан	МКЦ
В1-537, получен из штамма-реципиента В1-537	18,3±0,2	13,1±0,3	0,60±0,01
ЭГ1-ЭГ2, получен из штамма <i>P. verruculosum</i> -ЭГ1-ЭГ2	83,0±0,9	10,1±0,2	0,16±0,01
ЭГ2-КСИЛЕ, получен из штамма <i>P. verruculosum</i> -ЭГ2-КСИЛЕ	32,9±0,5	36,8±0,8	0,29±0,01
КСИЛЕ, получен из штамма <i>P. verruculosum</i> -КСИЛЕ	4,9±0,2	54,4±0,9	0,21±0,01

*Примечание: здесь и далее активности ферментных препаратов приведены в международных единицах; за 1 единицу активности принимают начальную скорость гидролиза субстрата, равную 1 мкмоль восстанавливающих сахаров (в глюкозном эквиваленте), образующихся за 1 мин при 50 °С и рН 5,0 (0,05 М Na-ацетатный буфер). Восстанавливающие сахара определяли методом Шомоди–Нельсона [24, 25]. Данные, характеризующие удельную активность по разным субстратам, взяты из нашей работы [16].

*Note: hereinafter, the activities of enzyme preparations are given in international units; one activity unit is defined as the initial rate of hydrolysis of the substrate, equal to 1 micromole of reducing sugars (in glucose equivalent), released in 1 min at 50 °C and pH 5.0 (0.05 M Na-acetate buffer). Reducing sugars are determined by the Shomogy-Nelson method [24, 25]. The data characterizing the specific activity for different substrates were taken from our work [16].

к питательным веществам и массообмен в кишечнике. На НПС происходит сорбция макро- и микро-элементов, которые затем выводятся из организма животных [20–22]. Моногастричные животные, а также птицы не имеют собственных ферментов, способных эффективно расщеплять НПС, поэтому в кормопроизводстве в качестве добавок используют ФП, в состав которых входят целлюлазы, β -глюканазы и ксиланазы. Это позволяет снизить вязкость содержимого кишечника и повысить усвояемость питательных веществ за счет ферментативного расщепления НПС [23, 24].

В качестве ферментов, гидролизующих НПС, мы выбрали эндо- β -1,4-глюканазу-1 (ЭГ1, GH7, 57 кДа, рI 4,6) *Nyrcorea jecorina*, гомологичную эндо- β -1,4-глюканазу-2 (ЭГ2, GH5, 40 кДа, рI 4,5) и эндо- β -1,4-ксиланазу Е (КСИЛЕ, GH10, 39 кДа, рI 5,4) *Penicillium canescens*. ЭГ1 характеризуется высокой ферментативной активностью по отношению целлюлозе, β -глюкану, ксилану и ксило-глюкану, ЭГ2 — к целлюлозе и β -глюкану, КСИЛЕ — по отношению к ксиланам, причем белковые ингибиторы ксиланаз из злаков (типа ТАХ1, Х1Р и другие) не влияют на активность КСИЛЕ. Эти три фермента обладают высокой термостабильностью, что важно для сохранения их активности при гранулировании комбикормов — необходимой стадии современного кормопроизводства (облегчает кормление, снижает потери корма, приводит к уничтожению вредных микроорганизмов [25, 26]), которую проводят при повышенной температуре.

В результате одновременной трансформации реципиентного штамма плазмидами, несущими гены *egl1* и *egl2*, получили штамм-продуцент ЭГ1 и ЭГ2 (*P. verruculosum*-ЭГ1-ЭГ2) [14].

При его культивировании в лабораторных ферментерах выход ферментов достигает 1 800 единиц эндо- β -1,4-глюканазной активности в 1 мл КЖ. При трансформации плазмидой, несущей ген *xylE*, получили штамм-продуцент КСИЛЕ (*P. verruculosum*-КСИЛЕ), который экспрессирует не менее 3 500 единиц ксиланазы в 1 мл КЖ лабораторных ферментеров. Одновременная трансформация реципиентного штамма плазмидами, несущими гены *egl2* и *xylE*, привела к созданию штамма-продуцент ЭГ2 и КСИЛЕ (*P. verruculosum*-ЭГ2-КСИЛЕ), который секретирует в КЖ до 1 200 ед/мл эндо- β -1,4-глюканазы и 3 500 ед/мл ксиланазы. Отметим, что указанный уровень ферментативной активности в КЖ был достигнут после оптимизации состава питательной среды и условий культивирования рекомбинантных штаммов в ферментерах [15].

Активность ФП, полученных в результате культивирования в лабораторных ферментерах соответствующих рекомбинантных штаммов, по отношению к различным субстратам приведена в табл. 2 [16]. Удельная эндо- β -1,4-глюканазная активность (при использовании в качестве субстрата карбоксиметилцеллюлозы, КМЦ) ФП ЭГ1-ЭГ2 и ЭГ2-КСИЛЕ была в 4,6 и 1,8 раз выше, чем для контрольного ФП В1-537, полученного из реципиентного штамма *P. verruculosum* В1-537 (*AniaD*). Удельная ксиланазная активность ФП КСИЛЕ и ЭГ2-КСИЛЕ выросла по отношению к контрольному ФП в 4,1 и 2,8 раза. Отметим, что общая активность рекомбинантных ФП ЭГ1-ЭГ2, ЭГ2-КСИЛЕ и КСИЛЕ по отношению к МКЦ (отражающая уровень целлюлогидролазной активности) уменьшилась в 3,8, 2,1 и 2,8 раза соответственно.

Компонентный состав лабораторных ферментных препаратов

Component composition of laboratory enzyme preparations

Ферментный препарат	Содержание ферментов, % от общего белка				
	ЦБГ	ЭГ1	ЭГ2	КСИЛЕ	Другие белки
<i>P. verruculosum</i> В1-537 (контроль)	60	12*		3	25
ЭГ1-ЭГ2	8	51	17	—	24
ЭГ2-КСИЛЕ	23	—	21	32	24
КСИЛЕ	26	—	2	42	30

*Примечание: указано общее содержание ЭГ. Данные взяты из нашей работы [16].

*Note: the total content of EG is indicated. Data are from our publication [16].

Компонентный состав сухих ФП приведен в табл. 3. Образец ФП, полученный с помощью реципиентного штамма, содержал значительное количество экзодеполимераз ЦБГ1 и ЦБГ2 — 60% от общего белка ФП. Эти ферменты важны для осуществления глубокой деструкции целлюлозы до растворимых сахаров, однако не играют заметной роли с точки зрения кормового применения, так как не приводят к заметному уменьшению вязкости НПС [25, 26]. В рекомбинантных ФП содержание эндодеполимераз, разрушающих НПС (эндо- β -1,4-глюканаза и эндо- β -1,4-ксилаза), существенно увеличилось — общее содержание ЭГ в ФП ЭГ1-ЭГ2 выросло до 78%, в ЭГ2-КСИЛЕ — до 21% (общее содержание ЭГ в контрольном ФП составляло 12%). Содержание КСИЛЕ в ФП ЭГ2-КСИЛЕ и КСИЛЕ увеличилось до 42 и 32% соответственно (по сравнению с 3% в контрольном ФП). Содержание эндодеполимераз в рекомбинантных ФП увеличилось, однако содержание ЦБГ1 при этом уменьшилось (до 8–26%) [27]. В целом, изменение состава ФП хорошо коррелирует с изменением их специфической активности: увеличение содержания ЭГ приводило к повышению удельной КМЦазной активности, увеличение содержания КСИЛЕ — к повышению удельной ксиланазной активности, а уменьшение содержания целлюбиогидролаз — к снижению удельной активности по отношению к МКЦ.

Новые ФП проявляют эндоглюканазную и ксиланазную активность в широком диапазоне рН и температуры, в том числе при физиологическом значении этих параметров (рН 3 и 7 и 37–38 °С), характеризуются высокой стабильностью эндодеполимераз при воздействии пищеварительных протеаз (пепсина и трипсина), а также их высокой стабильностью в условиях гранулирования комбикормов (80 °С). Важно, что белковые ингибиторы ксиланаз из злаков не влияют на ферментативную активность ксиланазы новых ФП [16, 25].

Опытные партии ФП, полученных с помощью штаммов-продуцентов ЭГ1 и ЭГ2 («Агроцелл Плюс», Свидетельство о Государственной регистрации кормовой добавки для животных ПВР-2-22.19/03489 от 27.06.2019), КСИЛЕ («Агроксил Плюс», Свидетельство о Государственной регистрации кормовой добавки для животных ПВР-2-9.19/03465 от 26.03.2019) и ЭГ2 и КСИЛЕ («Агроксил Премиум», Свидетельство о Государственной регистрации кормовой добавки для животных ПВР-2-22.19/03490 от 27.06.2019) выпускают в настоящее время на заводе по производству ферментов «Агрофермент» (Россия) и применяют для кормления цыплят-бройлеров и поросят [28, 29].

К ферментам, способным гидролизовать различные β -глюканы, помимо эндо- β -1,4-глюканаза (КФ 3.2.1.4), относятся эндо- β -1,3-глюканазы (ламинариназы, ЛАМ, К.Ф.3.2.1.39). Эндо- β -1,4-глюканазы гидролизуют β -1,4/ β -1,3-глюканы злаков по β -1,4-глюкозидным связям, тогда как ЛАМ расщепляют β -глюканы по β -1,3-глюкозидным связям. Таким образом, создание штаммов, способных к продукции как эндо- β -1,4-, так и эндо- β -1,3-глюканаза позволяет получить ФП, способные к максимально эффективной деструкции β -глюканов различного состава, входящих в состав НПС. Ранее при одновременной трансформации реципиентного штамма *P. verruculosum* В1-537 (*AniaD*) плазмидами, несущими гены гомологичной ЭГ2 и ЛАМ (GH16, 31 кДа, рI 4,1) *M. thermophila* нами был получен рекомбинантный продуцент, секретирующий эти оба фермента [30]. При культивировании в лабораторных ферментерах полученного штамма *P. verruculosum*-ЭГ2-ЛАМ в КЖ образуются до 850 ед/мл эндо- β -1,4-глюканазной (КМЦазной) и около 250 ед./мл эндо- β -1,3-глюканазной (ламинариназной) активности. Этот штамм характеризуется высоким уровнем экспрессии генов целевых ферментов — содержание

Удельная активность гомогенных рекомбинантных ЭГ и ЛАМ по отношению к различным субстратам
Specific activity of homogeneous recombinant EG and LAM towards different substrates

Субстрат	Ферменты, ед/мг*	
	ЭГ2	ЛАМ
β-глюкан ячменя	75±2	54,0±0,4
КМЦ	76±1	0
Ламинарин	0	15,2±0,4
Лихенан	94±3	56±1
Курдлан	0	5,3±0,2

*Примечание: реакцию проводили при 50 °С, рН 5,0. Данные взяты из нашей работы [30].

*Note: reaction was carried out at 50 °C and pH 5.0. Data are from our publication [30].

ЭГ2 и ЛАМ в составе ФП, полученных при его использовании, составляет примерно 20 и 40% от общего пула белка.

Данные, характеризующие субстратную специфичность гомогенных рекомбинантных ЭГ2 и ЛАМ (значения удельных активностей этих ферментов по отношению к различным субстратам) приведены в табл. 4 [30]. Рекомбинантная ЭГ2 обладает одинаковой активностью по отношению к КМЦ и β-глюкану ячменя (что было характерно и для фермента дикого типа [30]) и, кроме того, проявляет высокую гидролитическую активность к лихенану. Рекомбинантная ЛАМ эффективно расщепляет β-глюкан, ламинарин, лихенан и курдлан, но не КМЦ. Следует отметить, что оба фермента не активны по отношению к ксилану, МКЦ и *n*-нитрофенил-β-D-глюкозиду (пНФГ).

Отметим, что при исчерпывающем гидролизе β-глюкана и ламинарина под действием ЭГ2 или ЛАМ образуется ряд олигосахаридов со степенью полимеризации до 10. Следовательно, эти ферменты можно использовать для получения глюкан-олигосахаридов в производстве пребиотиков [31].

Фитаты (соли *D*-*мио*-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфорной кислоты) являются запасным соединением фосфора в семенах высших растений. Содержание фитина в зерне колеблется от 0,4 до 3,2%; фосфор фитина составляет 60–88% от общего содержания фосфора зерна [32]. Из-за очень низкой фитазной активности в пищеварительном тракте животных и птиц эта форма фосфора является недоступной для моногастричных животных. В результате основная часть фосфора (50–70%), входящего в состав кормов растительного происхождения, не усваивается организмом животных. Кроме того, фитиновая кислота связывается с ионами Ca²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, с белками, крахмалом и липидами, образуя малорастворимые соединения,

что значительно снижает питательную ценность кормов. Фитаза (*мио*-инозитолгексакисфосфат-3(6)-фосфогидролаза, КФ 3.1.3.8 и 3.1.3.26) гидролизует фитаты до неорганического фосфата и *мио*-инозитола и широко используется в качестве кормовой добавки для повышения пищевой ценности кормов [33].

Нами получен штамм *P. verruculosum* ФИТА — продуцент гетерологичной фитазы *A Aspergillus niger* (фитаза-3, 63 кДа, рI 4,2), который при культивировании в лабораторных ферментерах, а также в промышленных ферментерах завода «Агрофермент», эффективно экспресировал и секретировал в КЖ фитазу А, позволяя получать высокие уровни фитазной активности в КЖ (несколько тысяч ед/мл). Содержание фитазы в ФП ФИТА составляло 40–50% от общего белка. Фитаза А проявляет активность в широких диапазонах рН (от 2 до 7) и температуры (25–75 °С), оптимальные значения рН составляют 4,0–5,5, температуры — 50–55 °С. Фермент характеризуется относительно высокой термостабильностью и сохраняет 50% активности после прогревания при температуре 80 °С в течение 5 мин (неопубликованные данные).

Раффиноза и стахиоза, присутствующие в сое и других бобовых, используемых в качестве компонентов кормов животных и птицы, практически не усваиваются организмом животных (соя содержит до 6% галактоолигосахаридов). Галактоолигосахариды сбраживаются микрофлорой кишечника, что приводит к образованию газов и диарее. Решить эти проблемы позволяет использование ФП, содержащих α-галактозидазу [34]. α-Галактозидаза (КФ 3.2.1.22) катализируют гидролиз концевых невосстанавливающих α-D-галактозидных связей природных галактоолигосахаридов, галактоманнанов, галактолипидов, а также синтетических субстратов.

Наибольший практический интерес представляют α -галактозидазы, способные эффективно гидролизовать галактоолигосахариды. Это обусловлено тем, что именно раффинозу и стахиозу необходимо удалять из соевых продуктов, чтобы увеличить их питательную ценность.

В результате трансформации реципиентного штамма *P. verruculosum* B1-537 (*AniaD*) плазмидой, содержащей гетерологичный ген *aglC* α -галактозидазы С (АГЛС, GN36, 80 кДа, рI 4,8) *A. niger*, нами был создан высокоактивный штамм-продуцент α -галактозидазы С *P. verruculosum*-АГЛС (*неопубликованные данные*). При культивировании в лабораторных ферментерах этот штамм секретировал в 1 мл КЖ около 28 000 единиц α -галактозидазной активности (в качестве субстрата использовали *n*-нитрофенил- α -D-галактопиранозид). Сухой ФП, полученный с использованием штамма *P. verruculosum*-АГЛС, обладал α -галактозидазной активностью, равной нескольким миллионам ед/г, и содержал 39–40% АГЛС от общего пула белка (при содержании ЦБГ1 13–15%).

АГЛС эффективно гидролизовал раффинозу, стахиозу и *n*-нитрофенил- α -D-галактопиранозид (соотношение активностей по этим субстратам составило 0,20:0,23:1,00), но не расщеплял галактозо-содержащие полисахариды: галактоманнан, галактан, арабиногалактан (*неопубликованные данные*).

Целлюлозно-бумажная промышленность

В научной литературе широко обсуждается ферментативная модификация целлюлозных волокон для регулирования вязкости целлюлозы, ускорения процесса размола технической целлюлозы и улучшения ее бумагообразующих свойств (см. обзор [35]). Однако чрезмерное воздействие целлюлаз на целлюлозное волокно может привести к снижению его прочности и связующей способности, что приводит к уменьшению прочности бумаги [36–38]. Традиционные коммерческие целлюлазные ФП имеют высокое содержание целлобиогидролаз (60% и выше от общего пула белка [14]), агрессивных по отношению к целлюлозному волокну и приводящих к его разрушению. Основное позитивное влияние на целлюлозные волокна в процессе изготовления бумаги оказывают эндоглюканазы [36, 38, 39]. В связи с этим логично использовать для обработки волокна, обогащенные эндоглюканазами ФП с уменьшенным содержанием целлобиогидролаз. Для этой цели нами была выбрана ЭГ2, использованная выше для деструкции НПС. В результате трансформации реципиентного штамма *P. verruculosum* B1-537 (*AniaD*) плазмидой, содержащей гомологичный ген *egl2*, создан высокоактивный

штамм-продуцент *P. verruculosum*-ЭГ2, который при культивировании в лабораторных ферментерах секретировал в 1 мл КЖ 1900–2000 единиц КМЦазной активности [40].

Сообщалось, что ФП, полученный с использованием этого штамма (содержит около 60% ЭГ2), успешно применяется для биокаталитической модификации беленой сульфатной целлюлозы, предназначенной для производства бумаги [40]. Полученные с помощью электронной микроскопии микрофотографии обработанных ФП ЭГ2 целлюлозных волокон свидетельствуют о том, что основной эффект, вызываемый каталитическим действием ЭГ2, заключается в гидролитической деструкции поверхностных слоев целлюлозных волокон [40]. Волокна целлюлозы, обработанных ФП ЭГ2, по сравнению с контролем (ФП, полученный на основе реципиентного штамма) обладают более развитой наружной поверхностью, в большей степени фибриллированы, характеризуются более высокой эрозией структуры волокон. Это приводит к усилению гидратации волокон, что улучшает способность целлюлозы к размолу, а также увеличивает показатели прочности бумаги по сравнению с полученной из исходной целлюлозы.

Таким образом, ФП, обогащенный ЭГ2, отличается высокой специфичностью биокаталитического действия на волокно целлюлозы, что проявляется в улучшении ее бумагообразующих свойств.

Нефтедобыча

Для интенсификации добычи нефти и природного газа используют технологии гидроразрыва пласта (ГРП), в которых используют водные растворы веществ, обладающих высокой вязкостью. Это природные полисахариды, в том числе галактоманнан (гуаровая камедь). Следует учесть, что вязкость бурового раствора непосредственно после реализации его функции и завершения операции ГРП должна быть уменьшена *in situ* в стволе скважины. Это означает, что галактоманнан необходимо расщепить до низкомолекулярных сахаров, для чего в настоящее время применяют сильные окислители и другие агрессивные компоненты, которые оказывают негативное влияние на окружающую среду при попадании в открытые водоемы, грунтовые воды и отвалы на поверхности в районе скважин. Чтобы обеспечить безопасную для природы эксплуатацию скважин, для деструкции галактоманнана целесообразно применять обработку эндополимеразами, уменьшающими его вязкость [41].

Нами получен штамм *P. verruculosum*-МАН [42] — продуцент гетерологичной эндо- β -1,4-манназы *H. jecorina* (КФ 3.2.1.78, GN5,

Содержание пектинов в плодово-ягодном сырье [44]

The content of pectins in fruit and berry raw materials [44]

Плодово-ягодное сырье	Содержание пектинов, %	Выход сока, %
Клубника	0,6–0,9	40–45
Калина	0,6–0,76	50–60
Шиповник, боярышник	2,0–3,5	55–60
Слива	3,5–8,0	15–30
Виноград	0,25–1,0	70–75

50 кДа, рI 4,5). При его культивировании в лабораторных ферментерах в 1 мл КЖ содержится 1 200–1 300 единиц манназной активности. Содержание МАН в ФП составляет около 60% от общего пула белка [42]. Этот фермент обладал маннан-эндодеполимеразной активностью, приводящей к потере вязкости растворов субстрата, а его действие на галактоманнан сопровождалось образованием олигосахаридов. Гидролитическую активность МАН регистрировали в широком диапазоне рН (от 3 до 9,5) и температуры (20–90 °С) с оптимумом при рН 4,5–7,5 и 60–75 °С. Опытные партии ФП, полученных с использованием штамма *P. verruculosum*-МАН, уже прошли испытания как эффективные деструкторы галактоманнана в составе жидкостей для ГРП (*неопубликованные данные*).

Пищевая промышленность

Ферменты находят широкое применение в пищевой промышленности, в частности для производства соков и вин. Профильные предприятия стремятся к быстрой переработке больших объемов фруктов и ягод, расширяя при этом сырьевую базу и пытаясь снизить затраты на производство соков с сохранением их качества, основными критериями которого являются органолептические показатели, а также высокий уровень экстрактивных веществ, что обеспечивает пищевую ценность соков [43]. Достоинства готовых соков заключаются в их привлекательном внешнем виде, прозрачности, устойчивости при хранении, возможности их концентрирования без опасения желирования продукта.

Высокое содержание пектиновых веществ в растительных клеточных стенках плодово-ягодных культур часто приводит к затрудненности сокоотдачи. Так, при прессовании винограда (содержание пектиновых веществ от 0,25 до 1%) можно получить 75% сусла от массы используемого сырья, а при отжиме слив (содержание пектиновых веществ от 3,5 до 8%) в тех же условиях содержание извлекаемого сусла не превышает 30% [44, 45]. В табл. 5 представлено содержание пектиновых веществ в плодах

и ягодах, наиболее подверженных затрудненному прессованию и фильтрации при их обработке [44].

Для предобработки плодово-ягодного сырья используют различные методы: механическое воздействие, нагревание, вибрация и ультразвук, временное замораживание свежих плодов и ягод. Эти технологические приемы в определенной степени способствуют разрушению растительных клеточных стенок и позволяют получить больше сусла, но связаны с достаточно высокими энергетическими затратами или снижением качества конечного продукта [46]. В настоящее время наиболее перспективным направлением считается обработка плодово-ягодного сырья ферментами, позволяющими максимально эффективно решить задачи интенсификации технологических процессов.

Коммерческие ФП, используемые для обработки пектинсодержащих материалов, в подавляющем большинстве случаев содержат высокий процент пектолитических ферментов, но обладают невысокой активностью по отношению к целлюлозе и гемицеллюлозам. Другие коммерческие ФП, предназначенные, например, для эффективной биоконверсии растительного сырья, имеют высокую целлюлозолитическую и гемицеллюлозолитическую активность, но низкий уровень пектолитической активности [47]. Реципиентный штамм *P. verruculosum* В1-537 (Δ *niaD*) секретирует комплекс целлюлаз, способных эффективно гидролизовать целлюлозу, а также проявляет ксиланазную активность, хотя в экспрессируемых им ферментах нет расщепляющих пектины. На базе этого штамма мы создали продуценты пектиназ: пектинлиазы (ПЕЛ, КФ 4.2.2.10, ГН1, 38 кДа, рI 6,7) *Penicillium canescens* и эндо-1,4- α -полигалактуроназы (ПГ, КФ 3.2.1.15, ГН67, 39 кДа, рI 5,1) *Aspregillus niger*, — а также целлюлаз и ксиланаз для получения ФП, предназначенных для гидролиза природных пектин-, целлюлозо- и гемицеллюлозосодержащих субстратов [48]. Реципиентный штамм трансформировали плазмидой, содержащей ген *enpg*, а также одновременно двумя плазмидами, содержащими

Гидролитическая активность содержащих пектиназы ферментных препаратов на разных субстратах
Hydrolytic activity of pectinase-containing enzyme preparations towards different substrates

Субстрат	Ферментативная активность, ед/мг		
	ФП <i>P. verruculosum</i> В1-537	ФП <i>P. verruculosum</i> -ПГ	ФП <i>P. verruculosum</i> -ПГ-ПЕЛ
ПГК	52±1	16 300±200	17 300±200
Пектин цитрусовый	0	0	800±20
МКЦ	110±2	47±1	45±2
КМЦ	6 700±40	1 515±5	1 085
Ксилан березовый	7 000±100	2 070±20	2 315

Примечание: ПГК — полигалактурановая кислота. Данные взяты из нашей работы [48].

Note: PGA — polygalacturonic acid. Data are from our publication [48].

Содержание целевых рекомбинантных белков в различных ферментных препаратах
Content of target recombinant proteins in various enzyme preparations

Штамм, из которого получен ФП	Содержание целевого фермента, % от общего белка							
	ПГ	ПЕЛ	ИНУ	ДЕК	ЦБГ	ЭГ	КСИЛ	Другие
<i>P. verruculosum</i> В1-537	—	—	—	—	60	12	3	25
<i>P. verruculosum</i> -ПГ	4	0	—	—	55	18	1	22
<i>P. verruculosum</i> -ПГ-ПЕЛ	5	23	—	—	27	12	1	32
<i>P. verruculosum</i> -ИНУ	—	—	34	—	43	7	3	13
<i>P. verruculosum</i> -ДЕК	—	—	—	30	30	8	2	30

Примечание: ПГ — полигалактураноаза, ПЕЛ — пектинлиаза, ИНУ — экзоинулиназа, ДЕК — декстраназа. Данные взяты из нашей работы [48].

Note: PG — polygalacturonase, PEL — pectin lyase, INU — exoinulinase, DEX — dextranase. Data are from our publication [48].

гены *pelA* и *enpg*. В результате сконструировали рекомбинантные штаммы *P. verruculosum*-ПГ — продуцент ПГ — и *P. verruculosum*-ПГ-ПЕЛ — продуцент ПГ и ПЕЛ. При их культивировании получили лабораторные ФП, активность которых по отношению к различным субстратам приведена в табл. 6, а их состав — в табл. 7.

ФП, полученный с помощью реципиентного штамма *P. verruculosum* В1-537 (*AniaD*), практически не проявлял ни полигалактураназной, ни пектинлиазной активности, в то время как в рекомбинантных ФП их регистрировали (табл. 6). Так, высокая пектинлиазная активность выявлена для ФП ПГ-ПЕЛ, а высокая полигалактураназная — для ФП ПГ и ФП ПГ-ПЕЛ. Целлюлогидролазная активность новых ФП (по отношению к МКЦ) по сравнению с таковой для ФП из реципиентного штамма заметно снизилась, хотя оставалась на детектируемом уровне. Эндогликоканазная (по КМЦ) и ксиланазная активности в рекомбинантных ФП снизились по сравнению с ФП из реципиентного штамма, но также сохранились на заметном уровне.

Содержание полигалактураназы в ФП ПГ и ПГ-ПЕЛ составляло 4–5% от общего пула белка, а пектинлиазы в ФП ПГ-ПЕЛ было значительно выше — 23% (табл. 7). Общее содержание ЦБГ в рекомбинантных ФП снизилось примерно в 2 раза по сравнению с ФП, полученным из реципиентного штамма, что согласуется с понижением удельной активности рекомбинантных ФП по отношению МКЦ (табл. 6). Кроме того, в ФП ПГ и ПГ-ПЕЛ наблюдали снижение содержания ЭГ и ксиланазы, что также согласуется с понижением их удельных активностей по отношению к соответствующим субстратам.

Оптимальный уровень активности ПЕЛ регистрировали при 45–57 °С и pH в диапазоне 4,3–6,4; для ПГ — 39–50 °С и pH в интервале 3,6–4,7. Следует отметить, что оптимальные значения температуры и pH, как для ПЕЛ, так и для ПГ, находятся в диапазоне, характерном для грибных пектинлиаз и эндополигалактураназ [49, 50].

Полученные рекомбинантные пектолитические (мультиферментные) ФП были использованы для получения соков высокого качества

из различных видов плодово-ягодного сырья (калины, шиповника, боярышника, клубники) [51]. Наилучшие результаты показаны для ФП, в состав которого входил фермент ПЕЛ: выход суслу из калины возрос на 60–70%, из садовой клубники — на 200–300%, из шиповника — на 50%, из боярышника — на 20–30% по сравнению с выходом суслу из контрольных образцов, обработка которых ферментами не проводилась.

Применение ПЕЛ-содержащего ФП позволило увеличить содержание аскорбиновой кислоты и полифенольных веществ в соке шиповника и боярышника, а также повысить антиоксидантную активность сока. Для шиповника наблюдали увеличение содержания сухих веществ в среднем в 1,7 раза, полифенольных соединений в 1,5 раза, антиоксидантной емкости в 1,7 раза по сравнению с контрольными образцами; для боярышника содержание сухих веществ возросло в 1,2 раза, аскорбиновой кислоты — в 3,8 раза, полифенольных соединений — в 1,2 раза, антиоксидантная емкость повысилась в 4,3 раза [51].

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности использования новых ФП, в состав которых входят пектолитические, целлюлолитические и гемицеллюлолитические ферменты, в технологии производства соков из различных видов плодово-ягодного сырья.

Новые ФП были также использованы для изготовления в лабораторных условиях плодовых вин (из рябины, черной смородины и сливы), в технологию которых была включена стадия мацерации под действием ферментов [52, 53]. Применение новых ФП позволило более полно раскрыть свойства, присущие различному плодово-му сырию. Кроме того, удалось увеличить выход продукта из плодовой мякоти и получить легко осветляемые вина с меньшим содержанием летучих кислот и повышенной интенсивностью окраски. В ферментированном сусле было зафиксировано меньшее содержание взвесей по сравнению с контрольными образцами (без фермента), опытные образцы суслу отличались меньшей вязкостью. Ферментативная обработка мякоти позволила улучшить органолептические характеристики плодовых вин — они были более ароматными и с более насыщенным вкусом по сравнению с контрольными образцами [53, 54].

В исследованиях по токсикологическим и аллергизирующим свойствам неочищенных рекомбинантных пектолитических ФП выявлено отсутствие охратоксина А и наличие афлатоксина [55]. От примеси последнего ФП очищали ультрафильтрацией на патронах Vivaspin 500 (мембрана PES 5000; Sartorius GmbH, ФРГ) и подтверждали

отсутствие микотоксинов методом иммуноферментного анализа. Следует отметить, что в образце коммерческого ФП «Колор» (2045), использованного в качестве контроля, были обнаружены микотоксины, что не соответствует требованиям Технического Регламента Таможенного Союза ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств» (<http://docs.cntd.ru/document/902359401>).

Токсичность ФП определяли как 50%-ную летальную дозу для крыс; этот показатель оказался выше 5 г/кг массы животного, ФП не оказывал негативного влияния на эпителий тонкого кишечника и компонентный состав крови крыс по сравнению с контрольными группами животных. Аллергизирующие свойства ФП анализировали также на крысиной модели при внутрижелудочном введении пектолитических ФП в течение 42 сут. У животных не выявили признаков аллергических реакций [55].

Переработка сельскохозяйственных растений с целью получения разнообразных продуктов, в частности физиологически ценных полимеров (инулин и другие) — одно из важных направлений этой отрасли. В этом отношении особого внимания заслуживает многолетнее растение топинамбур (*Helianthus tuberosus*), которое благодаря уникальному составу биополимеров становится популярнейшей сырьевой культурой в пищевой промышленности не только России, но других стран. Топинамбур мало подвержен болезням, требует минимального ухода, не боится засухи и холода, а также может произрастать практически на любых почвах [56].

Весьма ценным компонентом клубней и стеблей топинамбура, представляющим интерес для биотехнологии, является полисахарид инулин (β -2,1-полифруктан), у которого на невосстанавливаемом конце полимерной молекулы находится остаток глюкониранозы. Содержание инулина в клубнях топинамбура достигает 80% по сухому веществу [57]. Источниками инулина могут служить также цикорий, агава, артишок, девясил, ягон и другие цветковые растения. Инулин является сырьем для производства широкого круга биотехнологически важных продуктов, таких как кристаллическая фруктоза, фруктозный сироп, фруктоолигосахариды, лимонная, молочная и fumarовая кислоты, а также биотопливо (биоэтанол, биобутанол) [58].

Важнейший этап переработки инулина в полезные продукты — гидролитическая конвертация в моносахариды (фруктозу и глюкозу) под действием экзоинулиназы (фруктан- β -(2,1)-фруктозидаза,

Таблица 8

Удельная активность экзоинулиназы на разных субстратах

Specific activity of exoinulinase towards different substrates

Источник инулина	Удельная активность, ед/мг
Агава	325
Цикорий	90
Артишок	10
Георгин	70
Топинамбур	80
Сахароза (Glc-Fru)	80
Раффиноза (Gal-Glc-Fru)	495
Стахиоза (Gal ₂ -Glc-Fru)	180

Примечание: данные взяты из нашей работы [61].

Note: data are from our publication [61].

КФ 3.2.1.80), гидролизующей по процессивному механизму концевые β -2,1-фруктозидные связи инулина и сахарозы [59].

Ранее в результате трансформации реципиентного штамма *P. verruculosum* В1-537 (*AniaD*) плазмидой, содержащей гетерологичный ген экзоинулиназы-1 (*inul1*) *Aspergillus awamori* (ИНУ, ГН32, 60 кДа, рI 4,3), нами был создан высокоактивный штамм-продуцент экзоинулиназы *P. verruculosum*-ИНУ [60]. При культивировании в лабораторных ферментерах активность экзоинулиназы превышала 2500 ед/мл КЖ. В сухом ФП, полученном с использованием этого штамма, инулиназная активность составила 38700 ед/г (сахаранная активность была идентичной), а содержание рекомбинантной экзоинулиназы — 34% от общего белка (табл. 7).

Гомогенная экзоинулиназа была наиболее активна по отношению к инулинам агавы, а к инулинам артишока и топинамбура (молекулы с малоразветвленной структурой) ее активность была соответственно в 3 и 4 раза ниже (табл. 8). Экзоинулиназа гидролизует и олигосахариды, содержащие остаток фруктозы на невосстанавливаемом конце. Ферментативная активность экзоинулиназы снижалась при увеличении степени полимеризации олигосахаридов (в ряду раффиноза→стахиоза) [61].

Возможности практического применения ФП экзоинулиназы можно продемонстрировать на примере получения глюкозы и фруктозы при гидролизе клубней топинамбура [61]. Измельченные на лабораторной мельнице клубни топинамбура в концентрации 100 г/л (в расчете на сухое

вещество) инкубировали с ФП ИНУ (0,5 ед/г сухого субстрата) при рН около 6 (водопроводная вода) и 50 °С в течение 3 ч. Полный гидролизат был представлен фруктозой и глюкозой в соотношении примерно 3:1. Отметим, что инкубация того же препарата корней топинамбура с ФП, полученным с использованием реципиентного штамма, не приводила к образованию фруктозы и глюкозы.

Декстраназа (α 1,6-*D*-глюкан-6-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.11) — фермент, катализирующий гидролиз α 1,6-гликозидных связей декстранов. Основными продуктами реакции ферментативного гидролиза декстранов являются изомальтотриоза, изомальтоза и глюкоза. Декстраназа находит применение в пищевой промышленности для синтеза изомальтоолигосахаридов, принадлежащих к группе пребиотиков. Одним из наиболее перспективных направлений использования декстраназ считается сахарное производство — для деполимеризации декстранов, продуцируемых бактерией *Leuconostoc* sp. на поверхности производственного сырья (свекла, сахарный тростник). Помимо пищевой промышленности декстраназа нашла применение в медицинской отрасли, в том числе для получения кровезаменителей, а также в процессах разложения бактериальных декстрановых отложений (пленок) на зубной эмали [62].

На базе реципиентного штамма *P. verruculosum* В1-537 (*AniaD*) создан высокоактивный штамм-продуцент гетерологичной декстраназы А (ДЕК, ГН49, 60 кДа, рI 4,55) *Penicillium funiculosum* [63]. При культивировании в лабораторных ферментерах штамм *P. verruculosum*-ДЕК секретирует в 1 мл КЖ более 27000 единиц декстраназной активности. В пересчете на сухой вес декстраназная активность ФП ДЕК составила 430000 ед/г при содержании рекомбинантной декстраназы ~30% от общего белка (табл. 7).

Рекомбинантная декстраназа выделена в гомогенном виде [63], а ее субстратная специфичность к ряду различных природных и синтетических углеводов представлена в табл. 9. Показано, что фермент эффективно гидролизует декстраны разной молекулярной массы, хотя несколько лучше низкомолекулярный. Интересно, что фермент гидролизует и не растворимые в воде поперечносшитые декстраны — Сефадексы G50–G200, но не G25 (скорее всего, мелкие поры препятствуют проникновению фермента внутрь носителя).

На ранних стадиях ферментативной реакции (10 мин) при минимальных дозировках фермента (2,5 ед/мл реакционной смеси) основными продуктами гидролиза декстрана были изомальтоолигосахариды со степенью полимеризации 2–16. При увеличении концентрации декстраназы

Удельная активность гомогенной рекомбинантной декстраназы А по отношению к различным субстратам
Specific activity of homogeneous recombinant dextranase A towards various substrates

Источник декстрана	Тип связи	Удельная активность*, ед./мг
Декстран 20 кДа	α 1,6	1 340±50
Декстран 70 кДа	α 1,6	1 210±40
Декстран 500 кДа	α 1,6	1 030±35
Инулин топинамбура	β 2,1	0
Крахмал картофельный	α 1,4	0
Сахароза	α 1,2	0
Сефадекс G25	α 1,6	0
Сефадекс G50	α 1,6	40±3
Сефадекс G75	α 1,6	40±3
Сефадекс G150	α 1,6	505±25
Сефадекс G200	α 1,6	778±28

Примечание: данные взяты из нашей работы [63].

Note: data are from our publication [63].

(5–10 ед/мл) выход изомальтозы и изомальтоолигосахаридов резко увеличивался. При исчерпывающем гидролизе (24–48 ч) изомальтоза и глюкоза превалировали в продуктах реакции, в то время как изомальтоолигосахариды детектировали в следовых количествах. Таким образом, варьируя дозировку фермента и время реакции, из декстрана можно получать либо изомальтоолигосахариды, либо изомальтозу — продукты с пребиотическими свойствами, которые могут найти применение в фармацевтической и/или в пищевой промышленности [63].

Охрана окружающей среды

Как уже отмечалось, мицелиальные грибы занимают лидирующую позицию в качестве объектов биотехнологического производства благодаря высокой продуктивности при глубинном культивировании на дешевых производственных средах и способности к синтезу широкого круга метаболитов, таких как ферменты, антибиотики, витамины и органические кислоты. В качестве промышленных продуцентов наиболее часто используют грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Hipocrea*. В процессе ферментации в качестве отхода образуется большое количество грибного мицелия — например, в результате производства лимонной кислоты на основе штамма *A. niger* в мире образуется до 0,34 млн т мицелия в год [64]. Лишь небольшой процент биомассы мицелия идет на корм скоту, что обусловлено ограниченной питательной ценностью продукта и связано с тем, что клетки грибов имеют прочную клеточную стенку, не доступную для действия пищеварительных ферментов.

Грибная биомасса не подлежит длительному хранению и является источником загрязнения окружающей среды; наиболее распространенным способом ее утилизации является сжигание [64, 65].

Клеточная стенка мицелиальных грибов состоит из гликопротеинов и полисахаридов, главным образом глюканов и хитина [66]. Глюканы являются основным структурным полисахаридом клеточной стенки (примерно 50–60% по сухой массе). От 65 до 90% глюканов приходится на долю β 1,3-глюкана, к которому ковалентно присоединены другие компоненты клеточной стенки. В разных грибах обнаружены также β 1,6-глюкан, смесь β 1,3/ β 1,4-глюканов, а также α 1,3- и α 1,4-глюканы [66, 67].

Хитин, линейный полимер β 1,4-*N*-ацетил-*D*-глюкозамина, также относится к структурно важным компонентам клеточной стенки грибов. Полимерные молекулы хитина соединены между собой множественными водородными связями, которые образуют микрофибриллы высокой степени кристалличности и высокой прочности. Хитин вместе с глюканами формирует скелет клеточной стенки [67].

В клеточных стенках мицелиальных грибов в той или иной форме содержатся также полимеры β -*D*-маннозы (маннаны, галактоманнаны, ксилломаннаны и глюкурономаннаны). Например у *A. fumigatus* галактоманан является важнейшим компонентом клеточной стенки и связан ковалентно с глюканами [66]. Соотношение хитина, глюканов и маннанов может меняться для разных родов и видов грибов, а также зависеть от состава среды культивирования [67].

Гидролитическая активность ферментных препаратов по отношению к различным полисахаридам, входящим в состав клеточной стенки грибов

Hydrolytic activity of enzyme preparations towards various polysaccharides of the fungi cell wall

Источник полисахарида	Ферментативная активность ферментных препаратов, ед/г				
	МАН	ЛАМ	ХИТ	ЛАМ+ХИТ	ЛАМ+ХИТ+МАН
Ламинарин	—	12 000±600	—	6 080±130	6 080±130
Галактоманнан	9 760±250	—	—	—	—
Хитин краба	—	—	147±10	—	75±7

Хитин-глюкановый комплекс мицелиальных грибов имеет большой потенциал для применения в медицине, пищевой и косметической промышленности, может быть использован в качестве сорбента, из него могут быть получены водорастворимые олигосахариды, обладающие иммуностимулирующими свойствами и антимикробной активностью [68–70]. Существующие физико-химические методы выделения хитин-глюканового комплекса из мицелия обладают определенными недостатками — в этом трудоемком процессе используются концентрированные кислоты и щелочи, что приводит к потере полезных свойств продукта и высокой себестоимости [70].

Весьма перспективным с нашей точки зрения представляется способ ферментативной деструкции полисахаридов клеточной стенки мицелиальных грибов, который позволяет осуществить экологически и экономически оправданный процесс переработки биомассы грибного мицелия как отхода микробиологической промышленности с получением биологически ценных компонентов в легкоусвояемой форме.

На основе реципиентного штамма *P. verruculosum* В1-537 (*ΔniaD*) нами созданы высокоактивные штаммы-продуценты ферментов, разрушающих полисахариды клеточной стенки мицелиальных грибов. Это штамм *P. verruculosum*-ХИТ — продуцент эндо-β1,4-хитиназы *Myceliophthora thermopila* (КФ 3.2.1.14, ГН18, 46 кДа), а также штаммы-продуценты эндо-β-1,3-глюканазы (ламинариназы) и эндо-β1,4-маннаназы (информация о получении индивидуальных продуцентов и свойствах последних двух ферментов приведена выше). Содержание ХИТ в ФП, полученном в лабораторном ферментере, составляет 30% от общего белка; выше отмечалось, что содержание ЛАМ и МАН в соответствующих лабораторных ФП составило 40 и 60% соответственно. Активность соответствующих ФП по отношению к различным субстратам приведена в табл. 10.

Для ферментативной деструкции клеточной стенки микроскопических грибов использовали

индивидуальные ФП ХИТ, ЛАМ и МАН, проявляющие активность по отношению к различным полисахаридам, входящих в состав клеточной стенки грибов, а также смеси этих ФП. Для проведения деструкции биомассы грибов использовали 10 мг белка ФП на 1 г сырой биомассы [71].

На рис. 1 приведены данные, характеризующие остаточной объем осадка биомассы грибов *P. verruculosum* и *A. awamori* после 24 ч обработки различными ФП. Объем биомассы мицелия *P. verruculosum* под действием ФП ЛАМ уменьшился в 1,8 раз по сравнению с образцом без добавления ФП, обработка мицелия этого гриба ФП ХИТ не приводила к существенному уменьшению объема биомассы. Напротив, в случае гриба *A. awamori* обработка ФП ХИТ приводила к 2,7-кратному уменьшению объема биомассы мицелия, тогда как обработка ФП ЛАМ была менее эффективной. Это свидетельствует о том, что преобладающим компонентом клеточной стенки *P. verruculosum* является 1,3-глюкан, а в случае *A. awamori* — хитин.

Использование смесового ФП ЛАМ+ХИТ, обладающего как эндо-β1,3-глюканазной, так и эндо-β1,4-хитиназной активностью, для деструкции мицелия обоих штаммов привело к уменьшению остаточного объема их осадков приблизительно в 2 раза. Препарат МАН не оказывал значительного влияния на изменение объема осадка при гидролизе мицелия обоих грибов. Однако использование смесового ФП ЛАМ+ХИТ+МАН позволило дополнительно снизить объем осадка мицелия до 47% для *P. verruculosum* и до 30% для *A. awamori*. Контрольный ФП, полученный с использованием реципиентного штамма В1-537 (*ΔniaD*), обладает целлюлолитической активностью, но это никак не влияло на объем биомассы мицелия обоих штаммов.

Данные, полученные с помощью анализа остаточного объема осадка мицелия, подтверждены результатами микроскопии, представленными на рис. 2 [71]. Как видно, наиболее полная деструкция клеточных стенок обеих культур

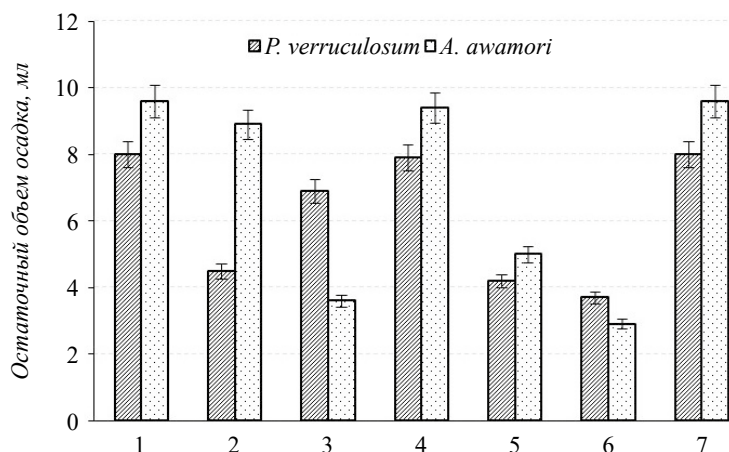


Рис. 1. Остаточный объем осадка мицелия после 24-часовой обработки биомассы штаммов *P. verruculosum* и *A. awamori* ферментными препаратами: 1 — контроль без ФП, 2 — ЛАМ, 3 — ХИТ, 4 — МАН, 5 — ЛАМ+ХИТ, 6 — ЛАМ+ХИТ+МАН, 7 — ФП из реципиентного штамма В1-537 ($\Delta niaD$). Рисунок взят из работы [71].

Fig. 1. Residual volume of mycelium sediment after the 24-h treatment of *P. verruculosum* and *A. awamori* biomass with various enzyme preparations: 1 — control without AF, 2 — LAM, 3 — HIT, 4 — MAN, 5 — LAM+HIT, 6 — LAM+HIT+MAN, 7 — recipient B1-537 strain ($\Delta niaD$). The data are from our publication [71].

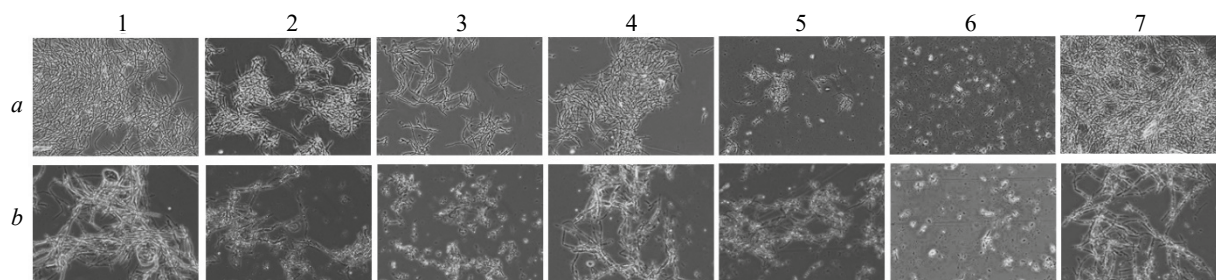


Рис. 2. Мицелий штаммов *P. verruculosum* (a) и *A. awamori* (b) после 24-часовой обработки ферментными препаратами: 1 — контроль без ФП, 2 — ЛАМ, 3 — ХИТ, 4 — МАН, 5 — ЛАМ+ХИТ, 6 — ЛАМ+ХИТ+МАН, 7 — реципиентный штамм В1-537 ($\Delta niaD$). Изображения получены на микроскопе Nikon Eclipse Ci. Приведены данные из нашей работы [71].

Fig. 2. Mycelium of *P. verruculosum* (a) and *A. awamori* (b) strains after 24 hours of treatment with enzyme preparations: 1 — control (without enzymes), 2 — LAM, 3 — HIT, 4 — MAN, 5 — LAM+HIT, 6 — LAM+HIT+MAN, 7 — recipient B1-537 strain ($\Delta niaD$). The images are obtained with a use of Nikon Eclipse Ci microscope. The data are from our publication [71].

достигалась при одновременном использовании трех ферментов: ЛАМ+ХИТ+МАН.

На основании приведенных данных можно говорить о перспективности использования ФП, содержащих ферменты, гидролизующие полисахариды клеточной стенки мицелиальных грибов, для биоконверсии отходов микробиологической промышленности. Очевидно, что для получения наиболее эффективного деструктора клеточных стенок мицелиальных грибов требуется препарат, содержащий в своем составе эндо- β -1,3-глюканазу, эндо- β 1,4-хитиназу и эндо- β -1,4-маннаназу.

В заключение можно отметить следующее. Особенностью реципиентного штамма *P. verruculosum* В1-537 ($\Delta niaD$) является собственный базовый комплекс внеклеточных целлюлаз (состоящий преимущественно из целлюлогидролаз и эндоглюканаз). Реципиентный штамм *P. verruculosum* обладает высокой секреторной способностью (до 60 г/л внеклеточного белка). Штамм является ауксотрофом с дефектом в гене *niaD*, кодирующем нитратредуктазу, что используется в качестве селекционного признака при

скрининге рекомбинантных штаммов. У реципиентного штамма снижена глюкозная катаболитная репрессия, что дает возможность культивировать его, используя глюкозу в составе питательной среды, а также в режиме с подпиткой глюкозой; биосинтез ферментов этого штамма индуцируется целлюлозой.

Экспрессионная система на базе гриба *P. verruculosum* позволяет эффективно использовать векторы, представляющие собой плазмиды или линейные молекулы ДНК, содержащие целевые гетерологичные или гомологичные гены, функционально связанные с промотором и терминатором «сильного» промотора гена *cbh1*, индуцируемого целлюлозой; причем генетическую трансформацию реципиентного штамма можно осуществлять одновременно несколькими векторными конструкциями. Как отмечалось, рекомбинантные штаммы-продуценты отличаются высокой продуктивностью целевых ферментов, а полученные с их помощью ФП могут содержать до 70% целевых ферментов (как правило, 30–60%) от общего пула секретируемого внеклеточного белка.

С помощью системы экспрессии на базе гриба *P. verruculosum* получены продуценты ряда промышленно важных ферментов, таких как эндоглюканазы, β -глюканазы, ксиланазы, маннаназы, фитазы, α -галактозидазы, пектинлиазы, полигалактуроназы, экзоинулиназы, декстраназы, хитиназы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования (Государственное задание 0104-2019-0009).

ЛИТЕРАТУРА

- Glick B.R., Pasternak J.J. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, 3rd edition. Washington, USA: ASM Press, 2003, 760. ISBN 1555812244, 9781555812249
- Carlile M.J., Watkinson S.C., Gooday G.W. The Fungi, 2nd edition. USA: Academic Press, 2001, 225–530. ISBN 9780127384467
- Lubertoz D., Keasling J.D. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnol. Adv.*, 2009, 27(1), 57–75. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.001
- Punt P.J., van Biezen N., Conesa A., et al. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.*, 2002, 20(5), 200–206. doi: 10.1016/s0167-7799(02)01933-9
- Nevalainen K.M., Te'o V.S., Bergquist P.L. Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends Biotechnol.*, 2005, 23(9), 468–474. doi: 10.1016/j.tibtech.2005.06.002
- Keranen K.M., Penttila M. Production of recombinant proteins in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1995, 6(5), 534–537. doi: 10.1016/0958-1669(95)80088-3
- Schuelein M., Rasmussen G., Patkar Sh.A., et al. A cellulase preparation comprising an endoglucanase enzyme. Patent WO 91/17243, submitted 14.11.1991.
- Schuelein M., Pedesen S., Heldt-Hansen H., et al. Xylanase, DNA sequences, coding for the xylanases and methods of use thereof. Patent US5610048, submitted 11.03.1997.
- Visser H., Joosten V., Punt P.J., et al. Development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a *Myceliophthora thermophila* isolate, previously known as *Chrysosporium lucknowense*. *Ind. Biotechnol.*, 2011, 7(3), 214–223. doi: 10.1089/ind.2011.7.214
- Sinitsyn A.P., Rozhkova A.M. *Penicillium canescens* host as the platform for development of a new recombinant strains producers of carbohydrases. In: Microorganisms in Biorefineries. Ed. Kamm B., USA: Springer, 2015, 1–19. doi: 10.1007/978-3-662-45209-7_1
- Синицын А.П., Окунев О.Н., Черноглазов В.М. и др. Штамм мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* — продуцент комплекса целлюлаз, ксиланазы и ксилоглюканазы и способ получения ферментного препарата комплекса целлюлаз, ксиланазы и ксилоглюканазы для гидролиза целлюлозы и гемицеллюлозы. Патент РФ 2361918, приор. 26.02.2008, опубл. 20.07.2009.
- Berlin A., Gilkes N., Kilburn D., et al. Evaluation of cellulase preparations for hydrolysis of hardwood substrates. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2006, 129–132(1), 528–545. doi: 10.1385/ABAB:130:1:528
- Синицын А.П., Рожкова А.М., Синицына О.А. и др. Генетическая конструкция для обеспечения экспрессии целевых гомологичных и гетерологичных генов в клетках мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*, используемого в качестве хозяина, способ получения штамма гриба *Penicillium verruculosum* и способ получения ферментного препарата. Патент РФ 2378372, приор. 03.03.2008, опубл. 10.09.2009.
- Синицын А.П., Зоров И.Н., Рожкова А.М. и др. Генетическая конструкция для обеспечения экспрессии комплекса ферментов эндоглюканаз и ксиланаз в клетках гриба *Penicillium verruculosum* и способ получения комплексных ферментных препаратов на его основе, предназначенных для кормопроизводства. Патент РФ 653429, приор. 10.05.2017, опубл. 08.05.2018.
- Сатрутдинов А.Д., Шашков И.А., Кондратьева Е.Г. и др. Оптимизация процесса культивирования штамма *Penicillium verruculosum* EX13 — продуцента ферментов для кормовых добавок. *Научные труды СК-ФНЦСВВ*, 2018, 21, 164–167.
- Синицын А.П., Короткова О.Г., Рубцова Е.А. и др. Конструирование рекомбинантных продуцентов ферментных препаратов для кормопроизводства с помощью экспрессионной системы на основе гриба *Penicillium verruculosum*. *Биотехнология*, 2019, 35(4), 6–14. doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-6-14
- Food Outlook. Biannual report on global food markets. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016, 133 с. ISBN 9781370289257.
- Чернышев Н.И., Панин И.Г., Шумский Н.И., Гречишников В.В. Антипитательные факторы кормов. Воронеж: Воронежская областная типография, 2013, 206 с. ISBN 978-5-4420-0151-8.
- Бутейкис Г., Блажинская Д. Ферменты — гарантия ощутимой выгоды сегодня и в будущем. *Комбикорма*, 2012, 6, 105–106. ISSN 0235-2605.
- Фаритов Т.А. Корма и кормовые добавки для животных: Учебное пособие. СПб.: Лань, 2010, 304 с.
- Annisson G., Choct M. Anti-nutritive activities of cereal non-starch polysaccharides in broiler diets and strategies minimizing their effects. *World's Poult. Sci. J.*, 1991, 47, 232–242. doi: 10.1079/WPS19910019

22. Bedford M.R., Classen H.L. An *in vitro* assay for prediction of broiler intestinal viscosity and growth when fed rye-based diets in the presence of exogenous enzymes. *Poult. Sci.*, 1993, 72(1), 137–143. doi: 10.3382/ps.0720137
23. Enzymes in Industry: Production and Applications, 3rd edition. Ed. Aehle W. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2007, 209–210. ISBN: 978-3-527-31689-2.
24. Simon O. Non starch polysaccharide (NSP) hydrolysing enzymes as feed additives: mode of action in the gastrointestinal tract. *Lohmann Information*, 2000, 23, 7–13
25. Синицын А.П., Рубцова Е.А., Шашков И.А., и др. Получение и свойства новых биокатализаторов, предназначенных для разрушения некрахмальных растительных полисахаридов. *Катализ в промышленности*, 2017, 17(4), 331–338. doi: 10.18412/1816-0387-2017-4-331-338
26. Рожкова А.М., Мерзлов Д.А., Баширова А.В. и др. Новые ферментные препараты для снижения вязкости цельнозерновых экстрактов ржи. *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*, 2018, 59(2), 132–137.
27. Чулкин А.М., Кислицин В.Ю., Зоров И.Н. и др. Определение копийности целевых генов карбогидраз в рекомбинантных штаммах гриба *Penicillium verrucosum*. *Биотехнология*, 2019, 35(5), 51–57. doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-51-57
28. Ниязов Н.С.-А., Кержнер М.А., Моисеев П.А. и др. Ферментный препарат «Агроксил Премиум» в комбикормах для свиней: эффективность от использования. *Свиноводство*, 2018, 5, 25–28.
29. Синицын А.П., Кержнер М.А., Мосеев П.А. и др. Влияние нового ферментного препарата Агроксил Плюс в составе комбикормов на продуктивность и переваримость питательных веществ у свиней. *Зоотехния*, 2018, 9, 11–14.
30. Мерзлов Д.А., Зоров И.Н., Доценко Г.С. и др. Свойства ферментных препаратов и гомогенных ферментов эндоглюканазы EG2 *Penicillium verrucosum* и эндоглюканазы LAM *Myceliophthora thermophila*. *Биохимия*, 2015, 80(4), 556–567.
31. Collins H.M., Burton R.A., Topping D.L., et al. Variability in fine structures of noncellulosic cell wall polysaccharides from cereal grains: potential importance in human health and nutrition. *Cereal Chem.*, 2010, 87(4), 272–282. doi: 10.1094/cchem-87-4-0272
32. Vohra A., Satyanarayana T. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2003, 23(1), 29–60. doi: 10.1080/713609297
33. Misset O. Phytase. In: Handbook of Food Enzymology. Eds Whitaker J.R., Voragen A.G.J., Wong D.W.S. New York, Basel: Marcel Dekker, Inc., 2003, 687–706. doi: 10.1590/S1516-93322004000200020
34. Синицына О.А., Федорова Е.А., Вакар И.М., и др. Выделение и свойства α -галактозидаз *Penicillium canescens*. *Биохимия*, 2008, 73(1), 127–138. doi: 10.1134/S000629790801015X
35. Новожилов Е.В. Применение ферментных технологий в целлюлозно-бумажной промышленности: монография. Архангельск: Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова (ИПЦ САФУ), 2013, 364. ISBN 978-5-261-00828-6.
36. Cui L., Meddeb-Mouelhi F., Laframboise F., Beaugard M. Effect of commercial cellulases and refining on kraft pulp properties: correlations between treatment impacts and enzymatic activity components. *Carbohydr. Polym.*, 2015, 115, 193–199. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.08.076
37. Lecourt M., Sigoillot J.-C., Petit-Conil M. Cellulase-assisted refining of chemical pulps: impact of enzymatic charge and refining intensity on energy consumption and pulp quality. *Process Biochem.*, 2010, 45(8), 1274–1278. doi: 10.1016/j.procbio.2010.04.019
38. Poshina D., Novozhilov E. Modification of spruce sulphite pulp by cellulase treatment. *Cellul. Chem. Technol.*, 2015, 49(2), 187–194.
39. Pere J., Siika-aho M., Buchert J., Viikari L. Effects of purified *Trichoderma reesei* cellulases on the fiber properties of kraft pulp. *Tappi J.*, 1995, 78(6), 71–78.
40. Синицын А.П., Рожкова А.М., Синицына О.А. и др. Получение биокатализатора на основе рекомбинантных целлюлолитических ферментных препаратов *Penicillium verrucosum* и его применение в бумажной промышленности. *Катализ в промышленности*, 2015, 15(6), 84–89. doi: 10.18412/1816-0387-2015-6-84-89
41. Mader D. Hydraulic proppant fracturing and gravel packing. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science, 1989, 32–40. ISBN 9780080868844.
42. Доценко Г.С., Семенова М.В., Синицына О.А. и др. Клонирование, выделение и характеристика галактоманнангидролизующих ферментов *Myceliophthora thermophila*. *Биохимия*, 2012, 77(11), 1556–1566.
43. Wong K.K.Y, Saddler J.N. Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries. In: Hemicellulose and Hemicellulases. Eds Coughlan M.P., Hazlewood G.P. London, GB: Portland Press, 1993, 127–143.
44. Фруктовые и овощные соки. Технология, химия, микробиология, экспертиза, значение и нормативное регулирование. *Серия: Научные основы и технологии*. Ред. Шобингер У., Колесникова А.Ю. СПб: Профессия, 2004, 639. ISBN 5-93913-062-3.
45. Самсонова А.Н., Ушева В.Б. Фруктовые и овощные соки (техника и технология), 2-е изд. М.: Агропромиздат, 1990, 287 с.
46. Сапожникова Е.В. Пектиновые вещества плодов. М.: Наука, 1965, 182 с.

47. Mamma D., Kourtoglou E., Christakopoulos P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresour. Technol.*, 2008, 99(7), 2373–2383. doi: 10.1016/j.biortech.2007.05.018
48. Бушина Е.В., Рубцова Е.А., Рожкова А.М. и др. Создание продуцентов целлюлолитических и пектолитических ферментов на основе гриба *Penicillium verruculosum*. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2015, 51(4), 402–411. doi: 10.7868/S0555109915040042
49. Рубцова Е.А., Бушина Е.В., Рожкова А.М. и др. Новые ферментные препараты с высокой активностью пектиназ и гемицеллюлаз на основе штаммов-продуцентов *Penicillium canescens*. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2015, 51(5), 502–510. doi: 10.7868/S0555109915050141
50. Сеницына О.А., Федорова Е.А., Семенова М.В. и др. Выделение и свойства внеклеточной пектинлиазы *Penicillium canescens*. *Биохимия*, 2007, 72, 699–706.
51. Волчок А.А., Бушина Е.В., Рожкова А.М. и др. Ферментные комплексы нового поколения для соковой промышленности. *Биотехнология*, 2013, 29(5), 78–89.
52. Volchok A., Rozhkova A., Zorov I., et al Production of fruit wines using novel enzyme preparations. *J. Int. Sci. Vigne Vin.*, 2015, 49, 205–215. doi: 10.20870/oeno-one.2015.49.3.80
53. Волчок А.А., Рожкова А.М., Зоров И.Н. и др. Использование новых мультиферментных комплексов в производстве фруктовых вин. *Известия ТСХА*, 2015, 5, 123–129.
54. Волчок А.А., Рожкова А.М., Зоров И.Н. и др. Использование ферментных комплексов нового поколения для обработки различных плодово-ягодных субстратов. *Виноградарство и виноделие*, 2014, 1, 36–39.
55. Волчок А.А. Новые мультиферментные комплексы для деструкции полисахаридов плодового сырья в условиях винодельческого производства. Автореферат диссертации (к. х. н.), МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 2016.
56. Пашенко Л.П. Национальные аспекты в переработке топинамбура. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 1991, 9, 25–27.
57. Park J.P., Kim D.H., Kim D.S., Yun J.W. Enzymatic production of inulo-oligosaccharides from chicory juice. *Biotechnology*, 1998, 20(4), 385–388. doi: 10.1023/A:1005383415013
58. Chi Z.-M., Zhang T., Cao T.-S., et al. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. *Bioresour. Technol.*, 2011, 102(6), 4295–4303. doi: 10.1016/j.biortech.2010.12.086
59. Arand M., Golubev A.M., Neto J.R., et al. Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori*. *Biochem. J.*, 2002, 362(1), 131–135. doi: 10.1042/bj3620131
60. Сеницын А.П., Рожкова А.М., Зоров И.Н. и др. Рекомбинантный штамм мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* (варианты) и способ получения ферментного препарата и его использование (варианты). Патент РФ 2646136, приор. 02.12.2015, опубл. 01.03.2018.
61. Волков П.В., Сеницына О.А., Федорова Е.А. и др. Выделение и свойства рекомбинантных инулиназ *Aspergillus* sp. *Биохимия*, 2012, 77(5), 611–621. doi: 10.1134/S0006297912050094
62. Khalikova E., Susi P., Korpela T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, 2005, 69(2), 306–325. doi: 10.1128/MMBR.69.2.306-325.2005
63. Volkov P.V., Gusakov A.V., Rubtsova E.A., et al. Properties of recombinant GH49 family dextranase heterologously expressed in two recipient strains of *Penicillium* species. *Biochimie*, 2019, 57, 123–130. doi: 10.1016/j.biochi.2018.11.010
64. Biotransformation of waste biomass into high value biochemicals. Eds Brar S.K., Dhillon G.S., Soccol C.R. USA: Springer, 2014, 504 p.
65. Камзолкина О.В., Дунаевский Я.Е. Биология грибной клетки. Учебное пособие, 2-е изд. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2017, 239 с. ISBN 978-5-9906564-1-3.
66. Bowman S.M., Free S.J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 2006, 28(8), 799–808. doi: 10.1002/bies.20441
67. Феофилова Е.П. Клеточная стенка грибов: современные представления о составе и биологической функции. *Микробиология*, 2010, 79(6), 723–733.
68. Singh A., Dutta P.K. Extraction of chitin-glucan complex from *Agaricus bisporus*: characterization and antibacterial activity. *J. Polym. Mat.*, 2017, 34(1), 1–9.
69. Клишанец Е., Лугин В., Литвяк В., Троцкая Т. Хитин-глюкановый комплекс: получение и свойства. *Наука и инновации*, 2016, 9(163), 62–67.
70. Otaka K. Functional oligosaccharide and its new aspect as immune modulation. *J. Biol. Macromol.*, 2006, 6(1), 3–9.
71. Серeda А.С., Великорецкая И.А., Осипов Д.О. и др. Ферментные комплексы для разрушения клеточной стенки мицелиальных грибов — продуцентов промышленных ферментов. *Известия Уфимского научного центра РАН*, 2018, 3(2), 31–35. doi: 0.31040/2222-8349-2018-2-3-31-35

Production of Industrial Enzymes based on the Expression System of the *Penicillium verruculosum* Fungus

A.P. SINITSYN^{1,2}, O.A. SINITSYNA², and A.M. ROZHKOVA^{1,2*}

¹ Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071, Russia

² Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia

*e-mail: amrojkova@yahoo.com

Received March 06, 2020

Revised April 23, 2020

Accepted December 1, 2020

Abstract—The review provides the data on the creation of highly active recombinant strains producers of a wide range of enzymes for various fields of industry and agriculture using the expression system of the *Penicillium verruculosum* filamentous fungus: endoglucanases, β -glucanases, xylanases, mannanases, phytases, α -galactosidases, pectin lyases, polygalacturonases, dextranases, exo-inulinases and chitinases. The recipient strain, *P. verruculosum* B1-537(Δ *niaD*), has a high secretory capacity (up to 60 g/L of extracellular protein in the culture liquid), and the recombinant producer strains are characterized by high productivity of target enzymes. The obtained enzyme preparations contain, as a rule, 30–70% of the target recombinant enzymes (in some cases, up to 80%) of the total protein pool. The *P. verruculosum* expression system makes it easy to transform expression constructs containing target heterologous or homologous genes, functionally linked to the promoter and terminator of the strong inducible promoter of the cellobiohydrolase-1 (*cbh1*) gene, and the genetic transformation of the recipient strain can be carried out simultaneously using several vector constructs. The incorporation of target genes into the chromosome of the recipient strain is an integrative process, and the foreign recombinant proteins encoded by them are not subjected to proteolysis. The technique of primary selection of positive transformants on agar media, as well as secondary selection during their cultivation in shaking flasks and fermenters, is simple and reliable in use, partly owing to standardized parameters: the nutrient composition of the fermentation medium and the culturing conditions of recombinant strains producing various target enzymes. The time spent on creating a producer of the target enzyme, from setting the problem to obtaining a recombinant strain, takes from 3 to 6 months. It is important to emphasize that recombinant *P. verruculosum* strains are successfully used in industrial processes as producers of various target enzymes.

Key words: expression system, cloning, industrial enzymes, feed additives, *Penicillium verruculosum*

Funding—The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (State Assignment 0104-2019-0009).

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-17-34