

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 577.15; 547.45

Конструирование рекомбинантных продуцентов ферментных препаратов для кормопроизводства с помощью экспрессионной системы на основе гриба *Penicillium verruculosum*

© 2019 А.П. СИНИЦЫН^{1,2}, О.Г. КОРОТКОВА^{2,**}, Е.А. РУБЦОВА², О.А. СИНИЦЫНА¹, Е.Г. КОНДРАТЬЕВА², А.С. СЕРЕДА³, И.Н. ЗОРОВ^{1,2}, А.М. РОЖКОВА^{2,*}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва

²Федеральный исследовательский центр Биотехнологии Российской академии наук, 119071, Москва

³Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии, 111033, Москва

*e-mail: amrojko@yandex.ru

**e-mail: littletemp@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.05.2019 г.

После доработки 18.06.2019 г.

Принята к публикации 05.07.2019 г.

С помощью экспрессионной системы на основе реципиентного штамма *Penicillium verruculosum* 537 (*ΔniaD*) и промотора гена целлюлогидролазы-1 были созданы штаммы-продуценты, позволившие получить новые ферментные препараты (ФП) для кормопроизводства, которые характеризуются высоким содержанием эндодеполимераз (эндо-β-1,4-глюканаза и эндо-β-1,4-ксилазазы), разрушающих некрахмальные полисахариды (НПС) зерна злаковых культур, используемых в кормах. Содержание эндодеполимераз в новых ФП составило 44–68% от общего содержания белка (по сравнению с 15% в случае реципиентного штамма), при этом содержание экзодеполимераз (целлюлогидролаз) уменьшилось до 8–26% по сравнению с 60% в случае ФП, полученного с помощью реципиентного штамма. Новые ФП характеризуются высокой удельной активностью эндодеполимераз, которая в 1,8–4,6 раза превышала таковую для ФП, полученных с помощью реципиентного штамма; удельная активность экзодеполимераз уменьшилась в 2–3,7 раза. Новые ФП проявляли эндоглюканазную и ксиланазную активность в широком диапазоне pH и температуры, в том числе при физиологическом значении этих параметров (pH 3, pH 7 и температура 37–38 °C); характеризовались высокой стабильностью эндодеполимераз при воздействии пищеварительных протеаз (пепсина и трипсина), а также в условиях гранулирования комбикормов (80 °C). Активность ксиланазы новых ФП не подавлялась белковыми ингибиторами злаков. Опытные партии новых ФП, произведенные заводом «Агрофермент», испытаны в кормлении цыплят-бройлеров и поросят. Ввод новых коммерческих ФП в их рационы оказал положительное влияние на увеличение живой массы, способствовал снижению расхода корма, протеина, обменной энергии на единицу прироста живой массы, улучшению переваримости и усвояемости питательных веществ корма, особенно сырой клетчатки и НПС.

Ключевые слова: ксиланаза, кормовые ферментные препараты, некрахмальные полисахариды, эндоглюканаза, *Penicillium verruculosum*

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-6-14

Список сокращений: ВС – восстанавливающие сахара; НПС – некрахмальные полисахариды; КЖ – культуральная жидкость; КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза; ФП – ферментные препараты; ЦБГ – целлюлогидролаза; FPLC – система для эффективной жидкостной хроматографии белка (Fast Protein Liquid Chromatography); $T_{50\%}$ и $pH_{50\%}$ – значения температуры и pH, при которых активность составляет 50% от максимальной.

Ферменты находят широкое применение в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства. Одним из важных направлений практического использования ферментов, таких как целлюлазы, β -глюканазы и ксиланазы, являются кормовые добавки. Зерно злаковых культур, которое широко используется в качестве основного компонента кормов для сельскохозяйственных животных и птицы, помимо питательных веществ (крахмал, белки), содержит некрахмальные полисахариды (НПС-целлюлозу, β -глюканы и ксиланы), снижающие доступ пищеварительных ферментов к питательным веществам и препятствующие полному усвоению кормов [1]. Содержание НПС в кормовом сырье варьирует в довольно широких пределах и может достигать до 13–15% от его массы [2].

Отрицательное воздействие НПС обусловлено их набуханием и образованием гелеобразных субстанций, которые затрудняют доступ пищеварительных ферментов к питательным веществам, а также массообмен в кишечнике. На НПС происходит сорбция макро- и микроэлементов, которые затем выводятся из организма животных [3–5]. Моногастричные животные, а также птицы, не имеют собственных ферментов, способных эффективно расщеплять НПС. Снять или частично уменьшить негативное влияние НПС при скармливании кормов на зерновой основе позволяет использование в качестве добавок в корма ферментных препаратов (ФП), в состав которых входят упомянутые выше карбогидразы – эти ферменты за счет разрушения НПС приводят к уменьшению вязкости содержимого кишечника и повышению усвояемости питательных веществ кормов [6, 7].

Важным источником технических ферментов являются микроорганизмы различных таксономических групп (бактерии, дрожжи, грибы) [8–10]. Преимуществом микроорганизмов как продуцентов ферментов является относительно короткий цикл роста, неприхотливость к составу питательной среды, способность к биосинтезу как одного (преобладающего) фермента, так и мультиферментных смесей, а также генетическая стабильность. Микроскопические грибы являются наиболее распространенными продуцентами технических ФП – среди них можно найти продуценты практически всех необходимых ферментов, используемых в промышленности или сельском хозяйстве.

Для осуществления экономически оправданного производства ферментов наиболее широко используются грибные продуценты с высокой

секреторной способностью. Увеличение продуктивности штаммов-продуцентов обычно достигают двумя основными подходами. Первый основан на использовании различных видов мутагенеза и селекции, второй – на методах генетической инженерии, позволяющих быстро и эффективно модифицировать исходные высокоактивные штаммы-продуценты с целью получения необходимых ферментов или ферментных комплексов. Манипуляции с ДНК клетки-хозяина или внесение в ДНК этой клетки экзогенного генетического материала дают возможность предсказуемо изменять штаммы-продуценты [11].

Мицелиальный гриб-целлюлолитик *Penicillium verruculosum* обладает значительным биотехнологическим потенциалом для использования его в качестве экспрессионной системы. Применение последовательных шагов мутагенеза и селекции позволило получить штамм *P. verruculosum* В221-151 с высоким уровнем секреции внеклеточного белка [12]. Из этого штамма была создана система экспрессии, в которой использовались промоторная и другие нетранслируемые области гена *cbh1*, кодирующего основной фермент целлюлолитического комплекса гриба *P. verruculosum* – целлюлобиогидролазу-1 [13]. Реципиентный штамм *P. verruculosum* В1-537 ($\Delta niaD$), сохранил высокую секреторную способность предшественника (до 50 г/л внеклеточного белка).

Реципиентный штамм *P. verruculosum* В1-537 ($\Delta niaD$) является ауксотрофом с мутацией в гене *niaD*, кодирующем нитратредуктазу, которая принимает участие в ассимиляции нитратного азота, поэтому он не способен расти на нитратном азоте, что используется в качестве селекционного признака при скрининге рекомбинантных штаммов. Следует отметить также, что у реципиентного штамма *P. verruculosum* В1-537 ($\Delta niaD$) редуцирована репрессия катаболизма глюкозы, что дает возможность культивировать его в режиме с подпиткой глюкозой.

Цель работы – выявить возможности экспрессионной системы штамма *P. verruculosum* В1-537 ($\Delta niaD$) для получения промышленно-ценных кормовых ферментов – карбогидраз.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Генетические конструкции

Элементы генетических конструкций соответствовали нуклеотидной последовательности промоторного региона гена *cbh1*, полноразмерного

целевого гена и терминаторной области гена *cbh1* и были соединены последовательно. Регуляторные элементы амплифицировали методом ПЦР, используя геномную ДНК штамма *P. verruculosum*. Нуклеотидные последовательности, соответствующие полноразмерным генам эндо-1,4-β-глюкоканазы-1 (ЭГ1), эндо-1,4-β-глюкоканазы-2 (ЭГ2) и ксиланазы E (Xyl E), также были амплифицированы методом ПЦР, в качестве матрицы использовали соответственно геномные ДНК штаммов *T. reesei*, *P. verruculosum* и *P. canescens*. Геномные ДНК этих штаммов выделяли с помощью набора фирмы QIAGEN (США) по стандартным протоколам.

Таким образом, были получены три конструкции для трансформации – pPrCBH1-EG1, pPrCBH1-EG2 и pPrCBH1-XylE. Отсутствие мутаций в конструкциях было подтверждено секвенированием всей полинуклеотидной последовательности по методу Сэнгера в обоих направлениях.

Трансформация штамма-реципиента *P. verruculosum* 537 (*ΔniaD*) и получение протопластов

Было проведено несколько трансформаций тремя вариациями смесей и индивидуальных плазмид, в соответствии с модифицированной методикой, разработанной для штамма *P. canescens* [14]: смесь 1 – плазмиды, содержащие гены *egl1* и *egl2*, смесь 2 – плазмиды, содержащие гены *egl2* и *xylE* и плазида, содержащая ген *xylE*. В качестве котрансформирующей плазмиды использовалась pSTA10, несущая ген нитратредуктазы, обеспечивающий комплементацию дефектного гена *niaD* в реципиентном штамме, что позволяло вести отбор трансформантов на среде с нитратом натрия.

Полученные трансформанты были проанализированы на наличие и уровень биосинтеза целевых ферментов, а также уровень концентрации внеклеточного белка в культуральной жидкости (КЖ). Отбор трансформантов, секретирующих в КЖ целевую активность проводили после ферментации отобранных трансформантов в качалочных колбах по специальной методике [15] (отбирали наиболее продуктивные варианты). В результате скрининга были отобраны лучшие в своих сериях штаммы *P. verruculosum*, обозначенные как PV-ЭГ1-ЭГ2, PV-ЭГ2-XylE и PV-XylE. Выбранные трансформанты были использованы для наработки сухих ФП после ферментации в 1-литровых ферментерах (по [15]).

Контролем служил сухой ФП, полученный с помощью реципиентного штамма *P. verruculosum* 537 (*ΔniaD*).

Методы определения активности ферментов

Для определения активности использовали следующие субстраты: натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), ксилан бука, микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ, авицел). Активность по отношению к полисахаридным субстратам определяли при 50 °С (для МКЦ – при 40 °С) и pH 5,0 по начальной скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС). Концентрацию ВС определяли методом Шомоди–Нельсона [16]. Концентрация полисахаридных субстратов в реакционной смеси составляла 5 г/л.

Активность ферментов выражали в международных единицах: 1 ед соответствует образованию 1 мкмоль продукта за 1 мин при действии ферментов на соответствующий субстрат.

Качественный и количественный состав ФП, а также их активность в условиях желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) животных и птицы определяли по методике [17–18]

Влияния белковых ингибиторов ржи на активность ксиланаз исследовали по методике [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантных ФП целевых ферментов

Были получены рекомбинантные штаммы *P. verruculosum* – продуценты ферментов, разрушающих НПС злаковых культур, из которых были выбраны ЭГ1 *T. reesei*, гомологичная ЭГ2 и XylE *P. canescens*. ЭГ1 характеризуется высокой молекулярной активностью по отношению к НПС, таких как целлюлоза, β-глюкан и ксилоглюкан; ЭГ2 – по отношению к целлюлозе и β-глюкану, а XylE – к ксиланаму [20–22]. Эти три фермента обладают высокой термостабильностью, что позволяет им сохранять активность при повышенной температуре на стадии гранулирования комбикормов. Эта стадия необходима в современном кормопроизводстве, поскольку облегчает кормление, снижает потери корма, приводит к уничтожению вредных микроорганизмов. Кроме того, активность XylE не подавляется белковыми ингибиторами злаков [23, 24].

Был создан штамм PV-ЭГ1-ЭГ2, который продуцировал одновременно ЭГ1 и ЭГ2, позволяющий получить при культивировании в лабораторных ферментерах до 1800 ед/мл эндо-β-1,4-глюкоканазной (КМЦ-азной) активности в КЖ; штамм PV-ЭГ2-XylE – продуцент ЭГ2 и XylE, который позволил получить в КЖ до 1200 ед/мл

КМЦ-азной и 3500 ед/мл ксиланазной активности; штамм PV-XylE – продуцент XylE, обеспечивающий активность ксиланазы в КЖ выше 3500 ед/мл [25–27]. Отметим, что указанный уровень активности в КЖ был достигнут после проведения оптимизации состава питательной среды и условий культивирования в ферментерах рекомбинантных штаммов [20, 28].

Активность ферментных препаратов

Активность сухих ФП, полученных после ферментации в лабораторных ферментерах соответствующих рекомбинантных штаммов, была определена по отношению к растворимым (КМЦ, ксилан) и нерастворимому (МКЦ) полисахаридным субстратам (табл. 1). Удельная КМЦ-азная активность ФП ЭГ1-ЭГ2 и ЭГ2-XylE, оказалась в 4,6 и 1,8 раза выше, чем у контрольного ФП 537, полученного с помощью реципиентного штамма. Удельная ксиланазная активность ФП XylE и ЭГ2-XylE выросла по отношению к контрольному ФП в 4,1 и 2,8 раза, соответственно. Отметим, что удельная КМЦ-азная активность ФП XylE уменьшилась по отношению к контрольному ФП в 3,8 раза; общая активность рекомбинантных ФП

ЭГ1-ЭГ2, ЭГ2-XylE и XylE по отношению к МКЦ (целлобиогидролазная активность) уменьшилась в 3,8, 2,1 и 2,8 раза, соответственно.

Состав ферментных препаратов

Компонентный состав ФП, определенный по методике [18], приведен в табл. 2. ФП, полученный с помощью реципиентного штамма, содержал 60% экзодеполимераз (от общего белка ФП), представленных целлобиогидролазами ЦБГ1 и ЦБГ2. 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 [4]. В рекомбинантных ФП содержание эндодеполимераз, разрушающих НПС, существенно увеличилось – общее содержание ЭГ в ФП ЭГ1-ЭГ2 выросло до 78%, в ЭГ2-XylE – до 21% (общее содержание ЭГ в контрольном ФП 12%). Содержание XylE в ФП ЭГ2-XylE и XylE увеличилось до 32 и 42%, соответственно, по сравнению с 3% в контрольном ФП. Содержание эндодеполимераз (эндоглюканаз и ксиланазы) в рекомбинантных ФП увеличилось за счет уменьшения содержания

Таблица 1

Удельная активность лабораторных ферментных препаратов по отношению к различным субстратам

Specific activity laboratory enzyme preparations to different substrates (unit/mg)

ФП	Удельная активность, ед/мг		
	КМЦ	Ксилан	МКЦ
PV-ЭГ1-ЭГ2 (№3.395.3)	83,0±0,9	10,1±0,2	0,16±0,01
PV-ЭГ2-XylE (№3.424.1)	32,9±0,5	36,8±0,8	0,29±0,01
PV-XylE (№3.426.3)	4,9±0,2	54,4±0,9	0,21±0,01
PV-537 (контроль)	18,3±0,2	13,1±0,3	0,60±0,01

Таблица 2

Компонентный состав лабораторных ферментных препаратов, определенный с помощью FPLC

The composition of laboratory enzyme preparations, determined by FPLC

ФП	Содержание ферментов, % (от общего содержания белка)				
	ЦБГ1 + ЦБГ2	ЭГ1	ЭГ2	XylE	Другие белки
PV-ЭГ1-ЭГ2	8	51	17	–	24
PV-ЭГ2-XylE	23	–	21	32	24
PV- XylE	26	–	2	42	30
PV-537 (контроль)	60	12		3	25

Примечание: ЦБГ – целлобиогидролазы, ЭГ1 – эндо-1,4-β-глюканаза-1 *T. reesei*, ЭГ2 – эндо-1,4-β-глюканаза-2 *P. verruculosum*, XylE – эндо-1,4-β-ксиланазы *E. P. canescens*

Note: CBH- cellobiohydrolases, EG1 – endo-1,4-β-glucanase 1 *T. reesei*, EG2 – endo-1,4-β-glucanase 2 *P. verruculosum*, XylE – endo-1,4-β-xylanase *E. P. canescens*

ЦБГ1 (до 8–26%). В целом, изменение состава ФП хорошо коррелирует с изменением их специфической активности: увеличение содержания ЭГ приводило к увеличению удельной КМЦ-азной активности, увеличение содержания Ху1Е – к увеличению удельной ксиланазной активности.

Физико-химические свойства ферментных препаратов

Оптимальное значение температуры для КМЦ-азной активности ФП ЭГ1-ЭГ2 и ЭГ2-Ху1Е составило 60–65 °С, причем эти ФП проявляли КМЦ-азную активность в широком диапазоне температур – значение $T_{50\%}$, составило 40–80 °С. Оптимальное значение рН для КМЦ-азной активности этих ФП составило 4,0–4,5, значение $pH_{50\%}$ составило 3,5–6,2 ед. (табл. 3).

Оптимальное значение температуры для ксиланазной активности ФП ЭГ2-Ху1Е и Ху1Е составило 60–65 °С, значение $T_{50\%}$ составило 35–80 °С. Оптимальное значение рН для ксиланазной активности этих ФП было 5,5, значение $pH_{50\%}$ составило 3,5–6,2 ед. (табл. 3).

Термостабильность КМЦ-азной и ксиланазной активности рекомбинантных ФП была изучена при температурах от 50 до 70 °С. При 50 °С ФП сохраняли 100% как КМЦ-азной активности, так и ксиланазной активности в течение более 3 ч, при 60 °С время полуинактивации КМЦ-азной актив-

ности составило 180 мин, ксиланазной – 60 мин, при 70 °С – 60 и 10 мин, соответственно (табл. 3).

Одним из этапов современного кормопроизводства является процедура горячего прессования (гранулирования) комбикормов. Этот процесс происходит при повышенной температуре (около 80 °С) в течение 10–90 с [15]. Поэтому важной характеристикой ФП, предназначенных для кормопроизводства, является их стабильность при указанной температуре. Для КМЦ-азной активности рекомбинантных ФП период полуинактивации при 80 °С составил 450 с, для ксиланазы – 200 с (табл. 3), что является достаточно высоким показателем с точки зрения стабильности и позволяет предполагать перспективность использования полученных ФП в качестве кормовой добавки в процессах кормопроизводства.

Влияние пепсина и трипсина на активность ферментных препаратов

При кормовом применении ФП важно учесть изменение активности и время сохранения активности ферментов в различных отделах ЖКТ животных или птицы после потребления ФП с кормом, в том числе воздействие собственных протеолитических ферментов (пепсина в желудке рН 3 и трипсина в кишечнике рН 7, при температуре 37–38 °С). При физиологических значениях рН и температуры рекомбинантные ФП

Таблица 3

Значения температуры и рН, при которых сохраняется активность и стабильность лабораторных ферментных препаратов

The values of temperature and pH, that save the activity and stability of laboratory enzyme preparations

Фактор	ЭГ1-ЭГ2	ЭГ2-Ху1Е		Ху1Е
	Активность и термостабильность, мин			
	КМЦ-аза	КМЦ-аза	Ксиланазы	Ксиланазы
T -оптимум °С	60–65	60–65	60–70	60–70
$T_{50\%}$, °С	40–80	40–80	35–80	35–80
рН-оптимум	4–4,5	4–4,5	5,5	5,5
$pH_{50\%}$	3,5–6,2	3,5–6,2	3,5–6,7	3,5–6,7
Период полуинактивации, мин при				
	50 °С	>180	>180	>180
	60 °С	180	180	60
	70 °С	60	60	10
80 °С	7,5	7,5	3,3	3,3

Примечание: $T_{50\%}$ и $pH_{50\%}$ – значения температуры и рН, при которых активность составляет 50% от максимальной. Инактивацию исследовали при рН 5,0.

Note: $T_{50\%}$ и $pH_{50\%}$ – temperature (°C) and pH at which the activity is 50% of the maximum; inactivation was investigated at pH 5.0

сохраняют значительный уровень КМЦ-азной и ксиланазной активности (табл. 3). Эндоглюканазы и Ху1Е оказались устойчивыми к действию пепсина желудочного сока – КМЦ-азная и ксиланазная активность ФП ЭГ1-ЭГ2, ЭГ2-Ху1Е и Ху1Е практически не изменялись в присутствии пепсина (при pH 3) в течение 3 ч. КМЦ-азная и ксиланазная активность рекомбинантных ФП практически не изменялась и при действии трипсина (при pH 7) в течение 3 ч [17].

Устойчивость ФП к белковым ингибиторам злаков

Одним из важных требований, предъявляемых к кормовым ФП, является низкая степень или полное отсутствие подавления белковыми ингибиторами злаков. В зернах пшеницы были обнаружены различающиеся по структуре и свойствам белковые ингибиторы ксиланаз, названные ТАХ1 I и ТАХ1 II (*Triticum aestivum* Xylanase Inhibitor) и ХИР (Xylanase Inhibiting Protein). ТАХ1 и ХИР-подобные ингибиторы были найдены и в других злаках – ячмене, ржи, рисе, кукурузе. Белковые ингибиторы ксиланаз способны специфично воздействовать на грибные и бактериальные ксиланазы, относящиеся к GH10 и GH11 семействам гликозил-гидролаз, наиболее часто используемых в составе кормовых ФП, но они не ингибируют эндогенные ферменты, продуцируемые самими растениями [21]. Ингибиторы оказывают негативное влияние на активность ферментов, в результате реализуется защитный механизм растений от фитопатогенных микроорганизмов. Присутствие ингибиторов ксиланаз в зерне уменьшает эффективность применения кормовых ФП. Отметим, что многие коммерческие кормовые ФП инактивируются белковыми ингибиторами злаков [24].

С помощью вискозиметрического метода, основанного на измерении вязкости водного экстракта ржи, богатого как высоковязкими ксиланами, так и белковыми ингибиторами ксиланаз, было показано, что ксиланазная активность ЭГ2-Ху1Е и Ху1Е не подавляется этими ингибиторами. Снижение вязкости происходит под действием ФП после термической обработки экстракта, которая не влияет на ксиланы, но приводит к инактивации белковых ингибиторов ксиланаз [19]. Степень уменьшения вязкости водных экстрактов ржи после их термической обработки составила примерно 60% [15]. Эндоглюканазная активность ФП ЭГ1-ЭГ2 и ЭГ2-Ху1Е белковыми ингибиторами злаков также не подавлялась [24].

Таким образом, полученные новые ФП характеризовались высоким содержанием и удельной активностью эндодеполимераз, разрушающих НПС. Эндодеполимеразы были активны в широком диапазоне pH и температуры, в том числе при их физиологических значениях (pH 3 и 7 на $T=37-38$ °C), стабильны при воздействии пищеварительных протеаз (пепсина и трипсина), стабильны в условиях гранулирования комбикормов (80 °C) и не ингибировались белковыми ингибиторами злаков. Это позволяет предположить высокую эффективность использования новых ФП для кормления сельскохозяйственных животных и птицы.

Испытания опытных партий ферментных препаратов

Опытные партии ФП ЭГ1-ЭГ2 (с коммерческим названием Агроцелл Плюс), ЭГ2-Ху1Е (Агроксил Премиум) и Ху1Е (Агроксил Плюс) были изготовлены на заводе по производству ферментов «Агрофермент» (Россия) и испытаны в кормлении цыплят-бройлеров [28] и поросят [11], показав весьма положительные результаты.

Установлено, что ввод этих ФП в рацион цыплят-бройлеров оказывает положительное влияние на их жизнеспособность – во всех опытных группах она составляла 100%. Наилучший результат кормления был достигнут при использовании ФП, содержащего ЭГ2 и Ху1Е (Агроксил Плюс). При его дозировке 50–75 г на 1 т комбикорма живая масса цыплят-бройлеров превышала таковую для контрольной группы, получавшей корма без добавления ФП, в возрасте 14 сут на 3,7 и 4,3%, в возрасте 21 сут – на 4,7 и 5,7%, в возрасте 35 сут – на 4,2 и 6,2%, соответственно. Затраты корма при использовании ФП Агроксил Плюс в дозировке 50 г/т составили 1,724 кг на 1 кг прироста живой биомассы цыплят, в дозировке 75 г/т – 1,660 кг/кг прироста [22].

Введение всех указанных выше коммерческих ФП в рацион поросят (75–100 г на 1 т комбикорма) также приводило к положительным результатам при кормлении и способствовало повышению среднесуточного прироста, снижению расхода корма, протеина, обменной энергии на единицу прироста, улучшало перевариваемость и усвояемость питательных веществ корма, особенно сырой клетчатки и НПС. Наилучший результат был показан с применением Агроксил Плюс (Ху1Е). При его дозировке 100 г/т среднесуточный прирост живой массы в конце опыта был на 11,0% больше, а расход корма,

сырого протеина и обменной энергии на единицу прироста на 9,8, 10,0 и 8,2% соответственно меньше по сравнению с контрольной группой. Добавка Агроксил Плюс способствовала повышению перевариваемости сухого и органического вещества на 2,07 и 2,15 абс. ед. Улучшение перевариваемости органической части корма произошло в основном благодаря лучшей перевариваемости сырого протеина, жира, клетчатки, крахмала, НПС – на 1,81 абс. ед., 3,76, 4,75, 1,77 и 1,79 абс. ед. выше, соответственно, по сравнению с перевариваемостью в контрольной группе. Агроксил Плюс способствовал более эффективному использованию обменной энергии корма. Увеличение количества питательных веществ, доступных для усвоения организмом животного, положительно повлияло на продуктивность поросят и качество мяса [11].

Итак, с помощью экспрессионной системы, основу которой составляет реципиентный штамм *P. verruculosum* 537 (*ΔniaD*) и промотор гена целлюбогидролазы-1, были созданы штаммы-продукты, позволившие получить новые ФП для кормопроизводства, которые характеризовались более высоким содержанием эндополимераз, эндо-β-1,4-глюканазы и эндо-β-1,4-ксилазазы, разрушающих НПС (44–68% от общего содержания белка, по сравнению с 15%, в случае использования реципиентного штамма), и уменьшенным содержанием экзополимераз (целлюбогидролаз) до 8–26% (60%, в случае реципиентного штамма). Удельная активность эндополимераз новых рекомбинантных ФП, превысила в 1,8–4,6 раза такую для ФП, полученных с помощью реципиентного штамма, а удельная активность их экзополимераз уменьшилась в 2,0–3,7 раза.

Новые ФП проявляли эндоглюканазную и ксиланазную активность в широком диапазоне pH и температуры, в том числе при физиологических значениях этих параметров (pH 3, pH7 и $T=37-38$ °C), характеризовались высокой стабильностью эндополимераз при воздействии пищеварительных протеаз (пепсина и трипсина), а также их высокой стабильностью в условиях гранулирования комбикормов (80 °C). Ксиланаза новых ФП не ингибировалась белковыми ингибиторами злаков.

Опытные партии новых ФП были изготовлены на заводе по производству ферментов «Агрофермент» и испытаны в кормлении цыплят-бройлеров и поросят. Ввод новых коммерческих ФП в рацион цыплят-бройлеров оказал положитель-

ное влияние на сохранность цыплят, увеличение их живой массы и уменьшение затрат кормов на увеличение прироста биомассы цыплят. Введение коммерческих ФП в рацион поросят также привело к положительным результатам при кормлении, способствовало повышению среднесуточного прироста биомассы поросят, снижению расхода корма, протеина, обменной энергии на единицу прироста живой массы, улучшению перевариваемости и усвояемости питательных веществ корма, особенно сырой клетчатки и НПС.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования (Государственное задание № 0104-2019-0009).

ЛИТЕРАТУРА

1. Чернышев Н.И., Панин И.Г., Шумский Н.И., Гречишников В.В. Антипитательные факторы кормов. Воронеж: Воронежская обл. типогр., 2013, 206.
2. Бутейкис Г., Блажинскас Д. Ферменты – гарантия ощутимой выгоды сегодня и в будущем. *Комбикорма*, 2012, (6), 105–106.
3. Фаритов Т.А. Корма и кормовые добавки для животных: Учебное пособие. СПб.: Лань, 2010, 304.
4. Annison G., Choct M. Anti-nutritive activities of cereal non-starch polysaccharides in broiler diets and strategies minimizing their effects. *World's Poultry Sci. J.*, 1991, 47, 232–242.
5. Beoford M.R., Classen H.L. An in vitro assay for prediction of broiler intestinal viscosity and growth when fed rye based in the presence of exogenous enzymes. *Poultry Sci.*, 1993, 72, 137–139.
6. Aehle W. (Ed.) Enzymes in industry: Production and applications. 3rd Edition. Wiley. Weinheim, 2007, 209–210.
7. Simon O. Non starch polysaccharide hydrolysing enzymes as feed additives: mode of action in the gastrointestinal tract. Berlin, Germany, Lohmann Information, 2000, 23, 7–13.
8. Naumoff D.G. Development of a hierarchical classification of the tim-barrel type glycoside hydrolases. Proceedings of the 1th International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure, 2006, 1, 294–298.
9. Наумов Д.Г. Иерархическая классификация гликозил-гидролаз. *Биохимия*, 2011, 76(6), 764–780.
10. Bedford M.R., Partridge G.G. Enzymes in farm animal nutrition. *CAB International*, 2001, 313.

11. Сеницын 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.
12. Патент РФ 2361918, Сеницын А.П., Окунев О.Н., Черноглазов В.М., Сеницына О.А., Попов В.О. Штамм мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* – продуцент комплекса целлюлаз, ксиланазы и ксилотриазиназы и способ получения ферментного препарата комплекса целлюлаз, ксиланазы и ксилотриазиназы для гидролиза целлюлозы и гемицеллюлозы, 20.07.2009, Бюл. № 20.
13. Сеницын А.П. Рожкова А.М., Сеницына О.А., Федорова Е.А., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Соколова Л.М., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Винецкий Ю.П., Черноглазов В.М., Зоров И.Н. 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 от 10.01.2010. Бюл. №1.
14. Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V. Integrative and replicative transformation of *Penicillium canescens* with a heterologous nitrate-reductase gene. *Current Genetics*, 1995, 28, 474–477.
15. Сеницын 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), 33–338.
16. Сеницын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы исследования и свойства целлюлолитических ферментов. М.: ВИНТИ, 1990, 25, 30–37.
17. Волчок А.А., Короткова О.Г., Кондратьева Е.Г. и др. Активность эндогликоказ и ксиланаз кормовых ферментных препаратов в условиях желудочно-кишечного тракта птицы. *Птицеводство*, 2018, (4), 39–45.
18. Короткова О.Г., Рубцова Е.А., Шашков И.А. и др. Сравнительный анализ состава и свойств кормовых ферментных препаратов. *Катализ в промышленности*, 2018, 18(4), 72–78.
19. Сеницын А.П., Зоров И.Н., Короткова О.Г., Мерзлов Д.А. Метод определения степени ингибирования ксиланаз белковыми ингибиторами злаков. *Птицеводство*, 2016, (1), 19–24.
20. 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 СКФНЦ-СВВ*, 2018, 21, 164–167.
21. Гусаков А.В. Белковые ингибиторы ксиланаз (Обзор). *Биохимия*, 2010, 75(10), 1331–1347.
22. Егоров И.А., Егорова Т.В., Мосеев П.А., и др. Ферментные препараты отечественного производства в комбикормах для цыплят-бройлеров. *Птицеводство*, 2018, (1), 16–19.
23. Денисенко Ю.А., Мерзлов Д.А., Гусаков А.В. и др. Сравнительная характеристика ксиланаз Ху1А и Ху1Е из гриба *Penicillium canescens*. *Вестник Московского университета*, 2015. Сер. 2. Химия, 56(6), 348–353.
24. Сеницын А.П., Шашков И.А., Рубцова Е.А., Короткова О.Г., Сеницына О.А. Влияние водных экстрактов ржи и ячменя на активность кормовых ферментов. *Птицеводство*, 2018. (11–12), 34–37.
25. Сеницын А.П., Короткова О.Г., Зоров И.Н., Рожкова А.М., Сеницына О.А., Шашков И.А., Матыс В.Ю., Немашкалов В.А. Штамм гриба *Penicillium verruculosum* ЕЕ-105 продуцент комплекса высокоэффективных эндогликоказ и ферментный препарат на его основе для использования в качестве кормовой добавки в зерновых кормах. Заявка на патент № 2018124491 от 04.07.2018.
26. Сеницын А.П., Осипов Д.О., Короткова О.Г., Зоров И.Н., Рожкова А.М., Сеницына О.А., Шашков И.А. Штамм гриба *Penicillium verruculosum* МХ-73 продуцент модифицированной ксиланазы е с повышенной термостабильностью и ферментный препарат на его основе для использования в пищевой и кормовой промышленности. Заявка на патент № 2018130499 от 22.08.2018.
27. Сеницын А.П., Зоров И.Н., Сеницына О.А., Рожкова А.М., Мерзлов Д.А., Матыс В.Ю., Шашков И.А., Сатрутдинов А.Д. Генетическая конструкция для обеспечения экспрессии комплекса ферментов эндогликоказ и ксиланаз в клетках гриба *Penicillium verruculosum* и способ получения комплексных ферментных препаратов на его основе, предназначенных для кормопроизводства, Патент RU 2653429 от 08.05.2018. Бюл. №13.
28. Шашков И.А. Создание ферментных препаратов нового поколения на основе мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* для применения в кормопроизводстве. Автореферат канд. дисс ... к.х.н., МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 2018.

Construction of Recombinant Producers of Enzyme Preparations for Fodder Production by Means of Expression System Based on *Penicillium verruculosum* Fungus

A.P. SINITSYN^{1,2}, O.G. KOROTKOVA², E.A. RUBTSOVA², O.A. SINITSYNA¹,
E.G. KONDRAT'EVA², A.S. SEREDA³, I.N. ZOROV^{1,2}, A.M. ROJKOVA^{2,*}

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991 Russia

²The Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences, Moscow 119071, Russia

³Russian Scientific Research Institute of Food Biotechnology, Moscow, 111033, Russia

*e-mail: amrojkova@yahoo.com

Received May 29, 2019

Revised June 18, 2019

Accepted July 05, 2019

Abstract—Using the expression system based on the recipient strain *Penicillium verruculosum* 537 (Δ *niaD*) and promoter of the cellobiohydrolase 1 gene, producing strains were created. That made it possible to obtain new enzyme preparations (EP) for feed production, which are characterized by a high content of exodepolymerases (endo- β -1,4-glucanases and endo- β -1,4-xylanase), degrading non-starch polysaccharides (NSP) of grain cereals used in feed. The content of the endodepolymerases in new EP was 44–68% of the total protein content (compared with 15% in the case of the recipient strain), the content of exodepolymerases (cellobiohydrolases) fell to 8–26% compared to 60% in the case of the EP, obtained using recipient strain. New EP had high specific activity of endodepolymerases, which is 1.8–4.6 times higher than for the EP obtained with the recipient strain; the specific activity of exodepolymerases decreased in 2.0–3.7 times. New EP showed endoglucanase and xylanase activity in a wide range of pH and temperature, including the physiological value of these parameters (pH 3 and 7 and $T=37$ – 38 °C); characterized by a high stability of endodepolymerases under the influence of digestive proteases (pepsin and trypsin), as well as the stability of endodepolymerases under granulation conditions of animal feed (80 °C). The xylanase of the new EP was not inhibited by the inhibitors of cereal proteins. An experimental batch of new EP was manufactured by the enzyme-producing plant “Agroferment” and tested in broiler and pig feeding. The input of new commercial EP into broiler diets has had a positive impact on the safety of chickens, increasing their live weight and reducing feed cost. The supplementation of commercial EP into pig ration also led to positive results during feeding, contributed to the increase in the average daily growth of pig biomass, reduced feed consumption, protein and metabolic energy per unit of live weight gain, improved digestibility and assimilability of feed nutrients, especially of raw fiber and NSP.

Key words: Feed enzyme preparation, xylanase, endoglucanase, non-starch polysaccharides, *Penicillium verruculosum*

Funding—The work was done with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education (State Task 0104-2019-0009).

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-6-14