УДК 577.15, 663.15, 664.121

НОВЫЙ ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ВЯЗКОСТИ ЦЕЛЬНОЗЕРНОВЫХ ЭКСТРАКТОВ РЖИ

А.М. Рожкова*, Д.А. Мерзлов, А.В. Баширова, И.Н. Зоров, О.Г. Короткова, И.А. Шашков, А.П. Синицын

*(Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова; Химический факультет Университета г. Базель, Швейцария; *e-mail: amrojkova@mail.ru)*

На основе низшего гриба *Penicillium canescnes* созданы новые рекомбинантные штаммы, комплекс внеклеточных ферментов которых содержит гомологичную эндо-1,4-β-ксиланазу Е (КсилЕ, КФ 3.2.1.8), экспрессирующуюся под контролем промотора гена *xylA*, кодирующего эндо-1,4-β-ксиланазуА. Проведено сравнительное исследование ферментных препаратов (ФП), полученных на основе культуральной жидкости исходного штамма (*Penicillium canescens* RN3-11-7) и новых рекомбинантных штаммов *P. canescens* серии КсилЕ. Изучена удельная активность ФП по специфическому субстрату (глюкуроноксилану березы), определен качественный и количественный компонентный состав новых ФП КсилЕ-В5и КсилЕ-С1, а также ФП RN3 из исходного штамма. Показано, что уменьшение приведенной вязкости для ФП КсилЕ-В5 в два раза выше по сравнению с ФП RN3 в экспериментах с нативными, не термоинактивированными водными экстрактами ржи, что обусловлено большим содержанием неингибируемой КсилЕ в составе новых ФП.

Ключевые слова: *Penicillium canescens*, эндо-1,4-β-ксиланазы Е, кормопроизводство.

Современные комбикорма для сельскохозяйственных животных представляют собой достаточно сложную смесь, сбалансированную по компонентам питательных веществ (крахмал и простые углеводы, белки, жиры, минеральные соли), а также по содержанию незаменимых аминокислот, премиксов (в том числе и ферментных препаратов) и показателю обменной энергии. В России в базовых рационах кормления моногастричных сельскохозяйственных животных и птицы в качестве источника углеводов используют злаковые культуры (пшеницу, ячмень, рожь, овес) [1]. Однако зерно, будучи основным компонентом комбикорма, содержит антипитательный фактор – набор некрахмальных полисахаридов (НПС), затрудняющих процесс переваривания [2]. Важнейший НПС злаков – ксилан. Именно вязкие растворы арабино-ксиланов, не гидролизуемых в желудочно-кишечном тракте, создают проблемы при кормлении ячменем и рожью и отчасти пшеницей (в зависимости от ее вязкости). Ксиланы сорбируют на себя значительную часть питательных веществ и жидкости, которые в неизменном виде выводятся из организма животных [3, 4]. Это приводит к перерасходу кормов и снижению показателей продуктивности у сельскохозяйственных животных и птицы. Решить данную проблему можно путем введения в корм ферментных препаратов (ФП), в частности эндо-1,4-β-ксиланаз [5].

Эффективность эндо-1,4-β-ксиланаз определяется степенью ингибирования этих ферментов под действием белков-ингибиторов, входящих в состав большинства злаков. Одно из наиболее важных требований, предъявляемым к современным эндо-1,4-β-ксиланазам – низкая степень ингибирования или ее отсутствие. Водорастворимые зерновые ингибиторы карбогидраз (семейства TAXI, XYP и др.) оказывают значительное воздействие на эндо-1,4-β-ксиланазы, относящиеся к 11-й семье гликозилгидролаз, в то время как ксиланазы, относящиеся к 10-й семье, менее подвержены ингибирующему воздействию [6].

В этой связи значительный интерес представляет эндо-1,4-β-ксиланаза Е (КсилЕ, КФ 3.2.1.8, GH10) микромицетного гриба *Penicillium canescens*, ранее выделенная и описанная в статье Т.В. Федоровой с соавт. [7]. Несомненным преимуществом данной ксиланазы считается повышенная термическая стабильность по сравнению с другой гомологичной ксиланазой – эндо-1,4-β-ксиланазой А (КсилА, КФ 3.2.1.8, GH10), выделенной ранее из гриба *P. canescens* [8]. Это свойство важно для процесса гранулирования и термообработки кормов. Более того, в работе Ю.А. Денисенко с соавт. было показано, что гомогенная форма

КсилЕ обладает устойчивостью к действию белковых ингибиторов ржи [9].

Таким образом, использование КсилЕ в качестве кормовой добавки имеет очевидные преимущества перед зарубежными аналогами, используемыми в современном российском кормопроизводстве. В предложенном исследовании получены новые ФП на основе реципиентного штамма низшего гриба *P. canescens* RN3-11-7, определены компонентный состав ФП с наибольшим содержанием КсилЕ и вязкость растворов экстрактов ржи при действии нового ФП в сравнении с рядом коммерческих препаратов.

Материалы и методы

Получение ферментных препаратов серии КсилЕ. Из геномной ДНК *P. canescens* методом ПЦР был выделен фрагмент, соответствующий гену *xylE* размером 1145 п.о. Для проведения ПЦР и выделения ПЦР-продукта использовали наборы реактивов фирмы «ThermoFisher Scientific» (США) и пару праймеров (5′→3′):

ACAGGCAGCAGGAGCTCCTCACTTGC,
AAGCCGAGCAGGTCTAGCACACACTGCAAGGC.

Выделенный ген *xylE* был клонирован в шаттл-вектор, и полученная плазмида pXYLE трансформирована в клетки *E. coli* для наработки и анализа ДНК-материала [10]. После подтверждения последовательности гена *xylE* секвенированием по методу Сэнгера в обоих направлениях плазмида pXYLE была трансформирована в протопласты лабораторного реципиентного гриба *P. canescens* RN3-11-7 по методике, описанной в [11]. В результате клонирования гена *xylE* получен набор рекомбинантных штаммов серии *P. canescens* КсилЕ, который был скринирован в качалочных колбах (750 мл) на ферментационной среде, содержащей свекловичный жом (3 г/л), ферментативный пептон (5 г/л) и KH_2PO_4 (2,5 г/л). Отбор трансформантов осуществляли по уровню ксиланазной активности в культуральной жидкости (КЖ) рекомбинантных штаммов, измеренной по глюкуроноксилану березы («Sigma», США), а также по данным ЭФ-ПААГ, проводимого по стандартной методике [12]. Концентрацию белка определяли с помощью модифицированного метода Лоури, используя БСА в качестве стандарта [13]. Сухие ФП получали путем лиофилизации КЖ, секретируемой рекомбинатными штаммами и штаммом-реципиентом.

Анализ компонентного состава ферментных препаратов. Для фракционирования ФП использовали хроматографическую систему AKTA Pure 100 («GE Healthcare», Швеция), а также колонки и носители фирмы «Pharmacia» и «GE Healthcare» (Швеция). Обессоливание и отделение пигментов ФП проводили на колонке с носителем Акрилекс P2 фирмы «Reanal» (Венгрия) в 20 мМ буфере Bis-Tris/HCl (pH 6,8). Далее проводили анионообменную хроматографию на колонке с носителем Source 15Q. Образец (общее количество белка 10 мг) наносили в стартовом буфере Bis-Tris/HCl (pH 6,8); связавшиеся белки элюировали градиентом концентрации NaCl от 0 до 0,4 М. Несвязавшиеся белки фракционировали с помощью гидрофобной хроматографии на колонке Source 15ISO, элюирование проводили при начальной концентрации сульфата аммония 1,7 М в линейном ниспадающем градиенте (50 мМ Na-ацетатный буфер; pH 5,0). В полученных фракциях определяли активность по отношению к различным субстратам (пНФ-β-галактозиду, глюкуроноксилану березы, ламинарину, пНФ-α-L-арабинофуранозиду), а также содержание белка [8].

Исследование влияния ферментных препаратов на вязкость экстрактов ржи. Экстракты ржи готовили по методике, описанной в работе А.П. Синицына с соавт. [14]. Влияние ФП на вязкость экстракта ржи изучали с помощью капиллярного вискозиметра Оствальда по следующей методике. К 4 мл экстракта в вискозиметре добавляли 1 мл Na-ацетатного буфера (0,1 М; pH 5,0), раствор перемешивали, продувая воздух с помощью резиновой груши, и инкубировали при 40 °С в течение 5 мин. Далее добавляли аликвоту раствора ФП (50 мкл) в 0,1 М Na-ацетатном буфере (pH 5,0), содержащую 1 Ед. ксиланазной активности, и через определенные промежутки времени измеряли время истечения экстракта из вискозиметра (при 40 °С). Время реакции отсчитывали от момента добавления к экстракту раствора ФП. Результаты представляли в виде уменьшения приведенной вязкости разбавленного экстракта после 20 мин ферментативной реакции. Приведенную вязкость определяли выражением:

$$\eta_{пр} = (\eta_{экстракт} - \eta_{буфер})/(\eta_{буфер} \times C),$$

где $\eta_{экстракт}$, $\eta_{буфер}$ – вязкость экстракта и буфера, определенная с помощью метода капиллярной вискозиметрии, C – концентрация полимера (г/л).

Время ферментативной реакции рассчитывали как сумму временных интервалов (время, прошедшее до начала измерения времени истечения раствора, + половина измеренного време-

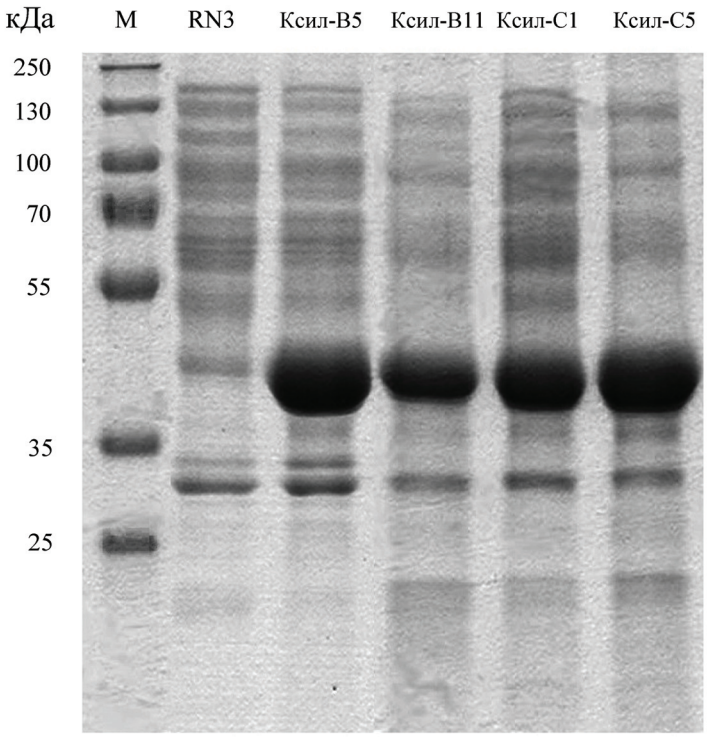

Рис. 1. Результаты ЭФ-ПААГ новых ФП серии КсилЕ, полученных на основе новых рекомбинантных штаммов *P. canescen,* экспрессирующих гомологичную ксиланазу КсилЕ

ни истечения). В случае нативного и термоинактивировнного экстрактов ржи pH был равен 5,2. Время истечения буфера составляло ~65 с, время истечения разбавленных «нативного» и «термоинактивированного» экстрактов ржи составляло соответственно ~330 и ~340 с.

В качестве препаратов сравнения в данном эксперименте использовали лабораторные препараты: RN3, полученный с использованием штамма-реципиента *P. canescens* RN3-11-7; КсилЕ-С1 и КсилЕ-В5, полученные на основе КЖ рекомбинантных штаммов *P. canescens* С1 и В5. Кроме того, использовали ряд коммерческих препаратов: Roxazyme G2G («DSM», Дания), Vilzyme («Glenmark», Индия), Xybeten XYL («HuverPharma», Болгария), Axtra XAP («Dupont», США).

Результаты и их обсуждение

Плазмида pXYLE была трансформирована в штамм-реципиент *P. canescens* RN3-11-7 совместно с трансформирующей плазмидой pSTA10, несущей ген нативной нитратредуктазы (*niaD*), комплементирующей дефектный ген нитратредуктазы в штамме-реципиенте для создания условий положительной селекции трансформантов на агаризованных средах с 10 мМ $NaNO_3$. В результате были получены 60 трансформантов, которые далее культивировали в качалочных колбах. В результате были отобраны четыре рекомбинантных штамма

Таблица 1

Общая активность ФП (ед/$г_{фп}$) по глюкуроноксилану березы и содержание белка (мг/г), полученных с помощью рекомбинантных штаммов-продуцентов и штамма-реципиента *P. canescens* RN3-11-7

Штамм	RN3	КсилЕ-В5	КсилЕ-В11	КсилЕ-С1	КсилЕ-С5
Глюкуроноксилан березы, ед/$г_{фп}$	14900±620	22500±800	16900±550	24400±900	19100±440
Содержание белка, мг/г	255±8	260±7	270±12	270±8	290±12

Таблица 2

Содержание основных компонентов исследуемых ферментных препаратов (%)

ФП	КсилЕ	Другие ксиланазы	АФ	ЛАМ	β-Гал	Другие ферменты
КсилЕ-В5	~30	15-20	14	2	1	33–35
КсилЕ-С1	~20	~28	15	2	1	30–35
RN3	3	~30	16	2	1	46–50

Penicillium canescens B5, B11, C1 и C5, в КЖ которых наблюдали наиболее высокие значения ферментативных активностей по глюкуроноксилану березы относительно значений соответствующих активностей в КЖ штамма-реципиента (данные не приведены). ЭФ-ПААГ образцов КЖ отобранных штаммов представлен на рис. 1, где видно наличие полосы массой 40 кДа у рекомбинантных штаммов, что свидетельствует об экспрессии КсилЕ. Для дальнейшей работы были отобраны два рекомбинантных штамма *P. canescens* B5 и C1, на основе которых были получены сухие ФП Ксил-В5 и ФП Ксил-С1. Ферментативные активности Ксил-В5 и Ксил-С1 приведены в табл. 1, где показано, что увеличение полосы КсилЕ на ЭФ-ПААГ соответствует повышению активности по глюкуроноксилану березы в новых ФП. Следует отметить, что ФП RN3 обладает относительно высокой активностью по ксилану, что вполне соответствует данным, полученным ранее [9]. Высокое значение активности обусловлено наличием ксиланазы А массой 31 кДа в секретируемой КЖ реципиентного штамма, однако биохимические свойства КсилА не отвечают требованиям к современным кормовым добавкам, поскольку она ингибируема и не обладает термостабильностью [9, 15]. Тем не менее промотор гена *xylA* («сильный» промотор) использовался в данной работе для экспрессии гена *xylE*. Поскольку ген *xylA* имеет множественную копийность в хромосоме гриба *P. canescens* [16], а интеграция гена *xylE* в локусы гена *xylA* происходит с различной вероятностью, то ксиланазная активность является общей и отражает суммарную активность

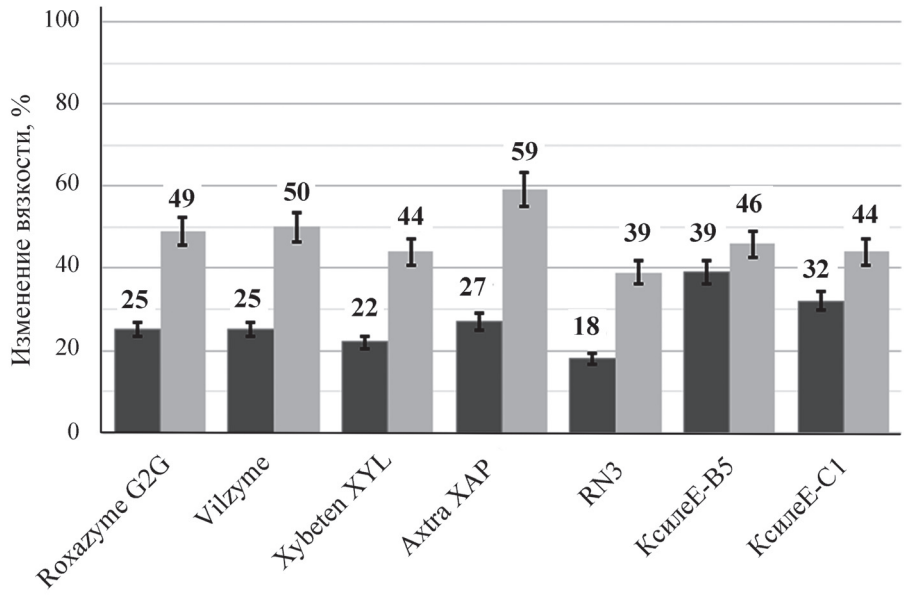

Рис. 2. Уменьшение приведенной вязкости водного экстракта ржи (0,1 М NaOAc; 40 ºС; pH 5,0) после 20 мин ферментативной обработки. Дозировка ФП – 1 ед. ксиланазной активности на 5 мл разбавленного экстракта

всех секретируемых ксиланаз в рекомбинантных штаммах (табл. 1). Для сравнения эффективности новых ферментных препаратов был проведен эксперимент по исследованию ингибируемости новых ФП цельнозерновыми экстрактами ржи в сравнении с коммерческими ФП и ФП RN3.

Результаты эксперимента представлены на рис. 2, из которого следует, что ФП КсилЕ-В5 и КсилЕ-С1 в среднем в два раза слабее ингибируются белками ржи, присутствующими в нативном экстракте, чем ФП RN3. Однако ксиланазная активность в термоинактивированных экстрактах ржи (т.е. в экстрактах, где белковые ингибиторы денатурированы) у ФП КсилЕ-В5, ФП КсилЕ-С1 и ФП RN3 примерно одинаковая. О коммерческих препаратах можно сказать, что они ингибируются, однако препарат Axtra XAP обладает более высокой ксиланазной активностью в термоинактивированных экстрактах ржи, что, вероятно, обусловлено высокой специфической активностью данного препарата. Таким образом, следует отметить, что меньшая степень ингибирования ФП КсилЕ-В5 и КсилЕ-С1 в нативных экстрактах ржи скорее всего обусловлена содержанием в них ксиланазы Е, которая по данным [9] практически не ингибируется. Для подтверждения этого предположения было проведено хроматографическое разделение ФП КсилЕ-В5, ФП КсилЕ-С1 и ФП RN3. В табл. 2 представлено примерное процентное содержание основных компонентов в составе новых ФП и контрольном ФП RN3. Как и ожидалось, все ФП содержат в основном ксиланазы, которые имеют разное соотношение в зависимости от типа ФП. Следует отметить, что содержание КсилЕ преобладает в рекомбинантных ФП, что соответствует данным ЭФ-ПААГ. В составе ФП присутствуют также β-галактозидаза (β-Гал), ламинариназа (ЛАМ) и арабинофуранозидаза (АФ) – базовые белки, секретируемые штаммом *P. canescens*. Их количество в ФП RN3 и новых ФП неизменно. Данные по компонентному составу ФП согласуются с изменением вязкости (рис. 2). Чем выше содержание в ФП неингибируемой КсилЕ, тем выше его устойчивость к белковым ингибиторам ржи, присутствующим в нативных водных экстрактах.

Таким образом, можно заключить, что использование КсилЕ в ферментных препаратах, полученных на основе рекомбинантных штаммов *P. canescens*, достаточно перспективно на отечественном рынке кормовых добавок.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России, ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (идентификационный номер ПНИЭР RFMEFI60716X0159), а также с использованием научного оборудования ЦКП «Промышленные биотехнологии» и АЦКП «Биоинженерия» ФИЦ Биотехнологии РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Чернышев Н.И., Панин И.Г., Шумский Н.И., Гречишников В.В.* // Антипитательные факторы кормов. Воронеж, 2013. 206 с.
2. *Jacob J.P., Pescatore A.J.* Barley β-glucan in poultry diets // Annals of Translational Medicine. 2014. Vol. 2. N 2.
3. *Бутейкис Г., Блажинскас Д.* Ферменты – гарантия ощутимой выгоды сегодня и в будущем // Комбикорма. 2012. № 6. С. 105.
4. *Choact M.* Non starch polysaccharides effect on nutritive value / *McNab J.M., Boorman K.N.* // Poultry Feedstuffs Supply, Composition and Nutritive Value. Trowbridge, 2002. P. 221.
5. *Aehle W.* // Enzymes in Industry: Production and Applications. Weinheim, 2007. P. 209.
6. *Гусаков А.В.* Белковые ингибиторы ксиланаз // Биохимия. 2010. 75. № 10. С. 1331.
7. *Федорова Т.В., Чулкин А.М., Вавилова Е.А., Майсурадзе И.Г., Трофимов А.А., Зоров И.Н., Хотченков В.П., Поляков К.М., Беневоленский С.В., Королева О.В., Ламзин В.С.* // Биохимия. 2012. Т. 77. № 10. С. 1433.
8. *Синицына О.А., Бухтояров Ф.Е., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Винецкий Ю.П., Синицын А.П.* // Биохимия. 2003. Т. 68. № 11. С. 1494.
9. *Денисенко Ю.А., Мерзлов Д.А., Гусаков А.В., Чекушина А.В., Синицын А.П.* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2015. Т. 56. № 6. С. 348.
10. *Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V., Clutterbuch A.J.* // Current Genetic. 1995. N 28. P. 474.
11. *Sinitsyn, A.P., Rozhkova, A.M.* // Penicillium canescens host as a platform for development of a new recombinant strain producers of carbohydrases. Microbiology Monographs. Berlin, 2015. P. 1.
12. *Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В.* // Методы изучения и свойства целлюлитических ферментов. М., 1990.
13. *Peterson, G.L.* // Analytical Biochemistry. 1979. Vol. 100. № 2. P. 201.
14. *Синицын А.П., Зоров И.Н., Короткова О.Г., Мерзлов Д.А.* // Птицеводство. 2016. № 1. С. 19.
15. *Синицына О.А., Гусаков А.В., Окунев О.Н.,*

Серебряный В.А., Вавилова Е.А., Винецкий Ю.П., Синицын А.П. // Биохимия. 2003. Т. 68. № 12. С. 1631.

16. *Винецкий Ю.П., Вавилова Е.А., Серебряный В.А., Чулкин АМ.* // Пат. РФ 2197526 С1. Бюл. 3. 23.07.2003.

Поступила в редакцию 27.11.17

NEW ENZYME PREPARATION TO REDUCE THE VISCOSITY OF THE WHOLE-GRAIN RYE EXTRACTS

A.M. Rozhkova*, D.A. Merzlov, A.V. Bashirova, I.N. Zorov, O.G. Korotkova, I.A. Shashkov, A.P. Sinitsyn

*(Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences; Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; Department Chemie, Universitat Basel, Basel, Switzerland; *e-mail: amrojkova@mail.ru)*

New recombinant strains complex of extracellular enzymes containing homologous endo-1,4-β-xylanase E (XylE, EC 3.2.1.8) has been developed on the basis of the micelial fungus *Penicillium canescnes* and has been expressed under the control of a promoter xylA gene encoding endo-1,4-β-xylanase A. A comparative study of enzyme preparations (EP) obtained from the culture fluids of the host strain, *Penicillium canescens* RN3-11-7, and new recombinant strains of *P. canescens* XylE series was carried out. The specific activity of the EP on the specific substrate, such as birch xylan, was analyzed, the qualitative and quantitative component composition of the new EPs, XyllE-B5 and XylE-C1, as well as the control EP was determined. It was shown that the decrease in the reduced viscosity for the EP XylE-B5 was twice as high as in comparison with the control EP RN3 in experiments with native aqueous extracts of rye, which is due to the high content of non-inhibited XylE in the composition of new EPs.

Key words: *Penicillium canescens*, endo-1,4-β-xylanase, fodder production.

Сведения об авторах: *Рожкова Александра Михайловна* – ст. науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (amrojkova@mail.ru); *Мерзлов Дмитрий Андрееевич* – аспирант химического факультета Университета г. Базель, Швейцария (dzmitry.miarzlou@unibas.ch); *Баширова Анна Вячеславовна* – науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (chekushina.ann@gmail.com); *Зоров Иван Никитич* – ст. науч. сотр. на кафедре химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова и науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (inzorov@mail.ru); *Короткова Ольга Генриховна* – науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (littletempo@yandex.ru); *Шашков Игорь Александрович* – мл. науч. сотр. ЦКП «Промышленные биотехнологии» Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, аспирант (igorshashkov@bk.ru); *Синицын Аркадий Пантелеймонович* – зав. лаб. на кафедре химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова и зав. лаб. биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, докт. хим. наук, профессор (apsinitsyn@gmail.com).