

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.15

НОВЫЕ КОРМОВЫЕ ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ДЕСТРУКЦИИ НЕКРАХМАЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ И ФИТАТОВ

Ольга Генриховна Короткова¹, Александра Михайловна Рожкова², Валерий Юрьевич Кислицин³, Ольга Аркадьевна Сеницына⁴, Юрий Андреевич Денисенко⁵, Мария Александровна Марочкина⁶, Иван Никитич Зоров⁷, Игорь Александрович Шашков⁸, Айдар Дамирович Сатрутдинов⁹, Аркадий Пантелеймонович Сеницын¹⁰

^{1-3, 5, 7-10} Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

^{2, 4, 6, 7, 10} Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет

Автор, ответственный за переписку: Александра Михайловна Рожкова
amrojkoval@yahoo.com

Аннотация. Созданы новые рекомбинантные штаммы *Penicillium verruculosum* с высоким уровнем экспрессии гомологичной эндо- β -1,4-глюканазы II и гетерологичной фитазы *A. niger*, а также гетерологичных эндо-1,4- β -ксиланазы *E. P. canescens* и фитазы *A. niger*, позволяющие получить высокоактивные кормовые ферментные препараты (ФП), способные одновременно значительно снизить вязкость некрахмальных полисахаридов, а также увеличить биодоступность фосфора и минеральных веществ кормов на основе зерновых культур и таким образом увеличить усвояемость питательных веществ кормов сельскохозяйственных животных и птицы. Изучена удельная активность ФП по специфическим субстратам (ксилану, β -глюкану, фитату), определен качественный и количественный компонентный состав новых ФП. На основе нового ферментного препарата, содержащего гомологичную эндо- β -1,4-глюканазу II и гетерологичную фитазу *A. niger*, получен штамм-рецепиент *ptaD*⁻, в который была успешно клонирована гетерологичная эндо-1,4- β -ксиланаза *E. P. canescens* и получен перспективный продуцент одновременно трех целевых ферментов.

Ключевые слова: некрахмальные полисахариды (НПС), фитаза, эндо- β -1,4-глюканаза, эндо-1,4- β -ксиланаза, ферментный препарат

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-2-178-186

Список сокращений: НПС – некрахмальные полисахариды, ФП – ферментный препарат, КМЦ – натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования (Соглашение № 075-15-2021-1071 от 28.09.2021).

Для цитирования: Короткова О.Г., Рожкова А.М., Кислицин В.Ю., Сеницына О.А., Денисенко Ю.А., Марочкина М.А., Зоров И.Н., Шашков И.А., Сатрутдинов А.Д., Сеницын А.П. Новые кормовые ферментные препараты для деструкции некрахмальных полисахаридов и фитатов // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 64. № 2. С. 178–186.

ORIGINAL ARTICLE

NEW FEED ENZYME PREPARATIONS FOR THE DESTRUCTION OF NON-STARCH POLYSACCHARIDES AND PHYTATES

Olga G. Korotkova¹, Alexandra M. Rozhkova², Valery Y. Kislitsin³, Olga A. Sinit-syna⁴, Yuri A. Denisenko⁵, Maria A. Marochkina⁶, Ivan N. Zorov⁷, Igor A. Shashkov⁸, Aidar D. Satrutdinov⁹, Arkady P. Sinitsyn¹⁰

^{1-3, 5, 7-10} Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
^{2, 4, 6, 7, 10} Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Corresponding author: Alexandra Mikhailovna Rozhkova amrojkova@yahoo.com

Annotation. New recombinant strains of *Penicillium verruculosum* have been created with a high level of expression of homologous endo- β -1,4-glucanase II and heterologous phytase A *A. niger*, as well as heterologous endo-1,4- β -xylanase E *P. canescens* and phytase A *A. niger*, allowing to obtain highly active feed enzyme preparations (AF) capable of simultaneously significantly reducing viscosity non-starch polysaccharides, as well as increase the bioavailability of phosphorus and minerals of grain-based feed and, thus, increase the digestibility of nutrients of agricultural animal and poultry feed. Specific AF activities for specific substrates (xylanau, β -glucan, phytate) were studied, the qualitative and quantitative component composition of new AF was determined. On the basis of a new enzyme preparation containing homologous endo- β -1,4-glucanase II and heterologous phytase A *A. niger*, a recipient strain Δ nia D – was obtained, into which heterologous endo-1,4- β -xylanase E *P. canescens* was successfully cloned and, thus, a promising producer of three target enzymes was obtained simultaneously.

Keywords: non-starch polysaccharides (NPS), phytase, endo- β -1,4-glucanase, endo-1,4- β -xylanase, enzyme preparation

Financial Support. The work was carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education (Agreement No. 075-15-2021-1071 dated 09/28/2021).

For citation: Korotkova O.G., Rozhkova A.M., Kislitsin V.Yu., Sinit-syna O.A., Denisenko Yu.A., Marochkina M.A., Zorov I.N., Shashkov I.A., Satrutdinov A.D., Sinitsyn A.P. New feed enzyme preparations for the destruction of non-starch polysaccharides and phytates // Vestn. Moscow. un-ta. Ser. 2. Chemistry. T. 64. № 2. P. 178–186.

Зерновые корма для сельскохозяйственных животных и птицы характеризуются наличием в них антипитательных компонентов, таких как некрахмальные полисахариды (НПС) и фитаты. К НПС относятся целлюлоза, β -глюканы и ксиланы, их содержание варьирует от 7–10% в пшенице до 17% в ячмене. НПС не усваиваются в желудочно-кишечном тракте в связи с тем, что в организме не вырабатываются соответствующие ферменты, при этом они ухудшают переваривание основных питательных веществ, поскольку повышают вязкость химуса, замедляют транзит корма в пищеварительном тракте и снижают всасывание переваренных продуктов [1–2]. Фитиновая кислота или фитат (соль фитиновой кислоты) – это химическое соединение шестиатомного спирта инозитола, к которому

присоединены 6 остатков молекул фосфорной кислоты. Неорганический фосфор (Pi) содержится в виде фитиновой кислоты в злаках, бобовых и масличных культурах, что делает его недоступным для метаболических процессов в живых системах. Кроме того, отрицательно заряженная фитиновая кислота образует комплексы с двухвалентными катионами, крахмалом и белками [3].

Наиболее распространенным способом уменьшения негативного влияния НПС и фитатов кормов является использование ферментных препаратов (ФП). Включенные в корм ферменты, дополняя пищеварительную систему сельскохозяйственных животных и птицы, обеспечивают конверсию НПС и высвобождение фосфора из фитатов, что в результате способствует улуч-

в колбах Эрленмейера в 100 мл ферментационной среды, содержащей (г/л): KH_2PO_4 – 1,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,03; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,03; глюкозу – 1,0; дрожжевой экстракт – 1,0; пшеничные отруби – 1,0; микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ) – 40,0, были отобраны два штамма *P. verruculosum* PhyEg76 и *P. verruculosum* PhyXyl41, согласно критерию наибольшей ферментативной активности по фитату натрия, Na-соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) и ксилану бука.

Получение сухих ферментных препаратов

Штаммы-продуценты *P. verruculosum* PhyEg76 и *P. verruculosum* PhyXyl41 культивировали в ферментерах объемом 3 л («Проинтех», Москва, Россия) на среде, содержащей (г/л): KH_2PO_4 – 7,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,23; глюкозной патоки – 57,0; дрожжевого экстракта – 10,0; пшеничных отрубей – 10,0; МКЦ – 40,0. Культивирование проводили при 30 °С и pH 4,8–5,0 в течение 6 суток, затем культуральную жидкость концентрировали и лиофильно высушивали для получения сухих ФП. Таким образом, были получены сухие ФП на основе рекомбинантных штаммов, продуцирующих: 1) фитазу *A. niger* и эндо-1,4-β-глюканазу II *P. verruculosum* – PV-Phy-EG-36; 2) фитазу *A. niger* и эндо-1,4-β-ксилазу E *P. canescens* – PV-Phy-Xyl-41.

Электрофорез в денатурирующих условиях (ДДС-электрофорез)

Для проведения ДДС-электрофореза использовали пластины с полиакриламидным гелем (4% концентрирующего и 12% разделяющего геля). Растворы ферментов предварительно обрабатывали 1%-м додецилсульфатом натрия и 5%-м β-меркаптоэтанолом при 100 °С в течение 15–20 мин. Окраску белковых полос в гелях проводили красителем Coomassie-Brilliant Blue G-250 фирмы «Helicon» (Россия). В качестве стандарта молекулярных масс применяли белковый маркер фирмы «Thermo Scientific» (США) с диапазоном 14,4–116,0 кДа (#26610).

Идентификация ферментов методом масспектрометрии

Исследования осуществляли по методике, изложенной в [14, 15]. Масс-спектрометрию проводили в ЦКП ФИЦ Биотехнологии РАН на приборе «MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme»

фирмы «Bruker» (Германия). Полученные значения массы пептидов анализировали с помощью MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), а также сопоставляли с теоретически рассчитанными значениями молекулярной массы возможных пептидов, полученных с помощью программы PeptideMass (<http://expasy.org/tools/peptide-mass.html>) на основании известных аминокислотных последовательностей фитазы *A. niger*, эндо-β-1,4-глюканазы II *P. verruculosum* и эндо-1,4-β-ксилазы E *P. canescens*.

Получение реципиентного штамма *P. verruculosum* PhyEG36 ($\Delta niaD$) методом CRISPR/CAS и трансформация его плазмидой pCBHI-xylE

Для нокаута гена *niaD* *A. niger*, который используется для восстановления генотипа *niaD*⁺ при получении рекомбинантных штаммов *P. verruculosum* проводили трансформацию штамма *P. verruculosum* PhyEG36 плазмидой pGCS, несущей ген нуклеазы Cas9 и последовательность, кодирующую sgPHK, по ранее описанной методике [16, 17]. Трансформанты с генотипом *P. verruculosum* $\Delta niaD$ отбирали на селективной среде (СМ) с добавлением 10 мМ NH_4Cl в качестве источника азота и 0,7 М NaClO_3 в качестве селективного агента. Колонии, выросшие на этой среде, пересеивали на минимальную среду (МС) с NH_4Cl или NaNO_3 в качестве источника азота. Клоны, способные расти на NaNO_3 , исключали из дальнейшего анализа.

Из отобранных на селективной среде клонов выделяли геномную ДНК с помощью набора DNeasy Plant Mini Kit («Qiagen», Нидерланды). Выделенную ДНК использовали для амплификации фрагментов гена *AnniaD* с помощью праймеров:

pSTA3500R	gatgctcacctgccaataggc
pSTA2950F	gtgatcaggacggagatcctcg

Полученные фрагменты ДНК использовали для секвенирования и поиска мутаций.

Получение плазмиды pGCS

Последовательность протоспейсера для нокаута гена *AnniaD* (5'-tcaaagcttcgcactccgt-3') была подобрана в программе ChopChop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>). Плазмиду pGCS (рис. 1) получали путем лигирования по рестрикционным сайтам *Bam*HI и *Sal*I в плазмиду pGpdCas9 [18] фрагмента, кодирующего sgPHK со спейсером для нокаута гена *AnniaD* из предварительно по-

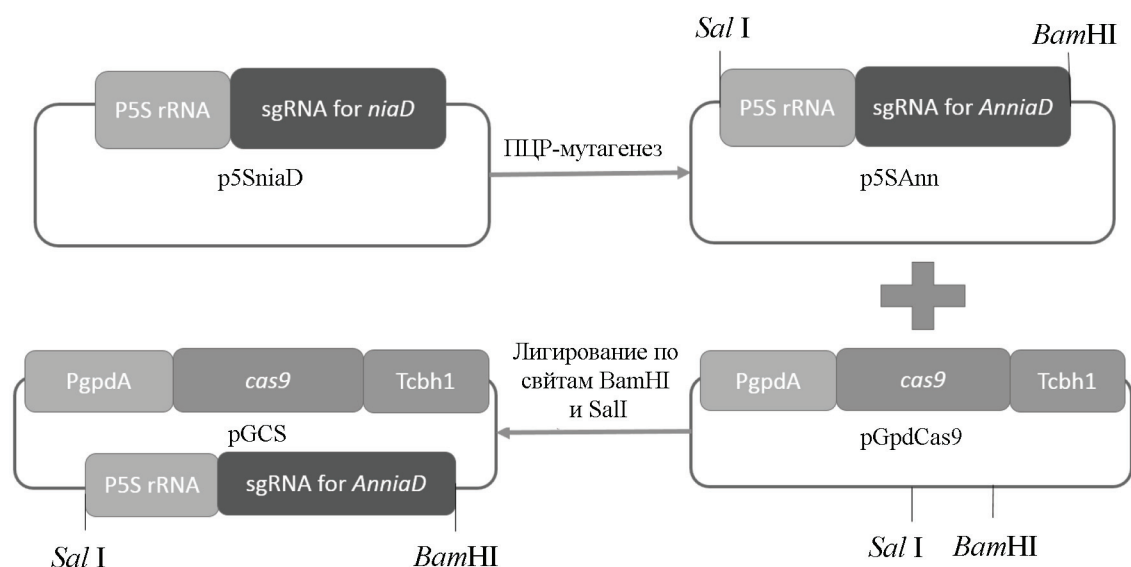


Рис. 1. Схема получения плазмиды pGCS

лученной плазмиды p5SAnn. Плазида p5SxlnR была получена из плазмиды p5SniaD [18] в результате замены последовательности спейсера sgРНК с помощью ПЦР-мутагенеза при использовании праймеров:

pSTAF tcaaaggcttcgactccggtgttttagactagaa
atagcaag
pSTAR acggagtgcgaagcctttgactattcgtccttca
tacaacag

Для молекулярного клонирования использовали штамм *Escherichia coli* XL1-Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для клонирования проводили с использованием ДНК-полимеразы Phire Hot Start II DNA Polymerase («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Все праймеры были разработаны с помощью программного обеспечения SnapGene 3.2.1.

Определение концентрации белка

Содержание белка в ФП определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта БСА [19].

Определение активности фитазы

Метод определения фитазной активности основан на скорости образования свободного фосфата при гидролизе фитата натрия из риса (ГОСТ 31487-2012). Для определения фитазной активности использовали 1,4 мМ раствор фитата натрия в 0,1 М Na-ацетатном буфере, рН 5,0. Раствор субстрата (300 мкл) смешивали с 33 мкл

раствора фермента и инкубировали 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 335 мкл 10%-го раствора ТХУ (трихлоруксусной кислоты). Концентрацию свободного фосфата (Pi) определяли с помощью аммоний-молибденового реагента (13 мМ FeSO₄·7H₂O / 8,1 мМ (NH₄)₆Mo₂O₂₄·4H₂O/0,533 М H₂SO₄). Реакционную смесь инкубировали с 665 мкл свежеприготовленного реагента в течение 30 мин при комнатной температуре. Светопоглощение измеряли при 750 нм. Концентрацию Pi определяли исходя из калибровочного графика, полученного с помощью КН₂Р₄ (0–0,2 г/л). За единицу активности принимали количество фермента, способного высвободить 1 мкмоль Pi за 1 мин [20].

Определение активности эндо-β-1,4-глюканазы и эндо-β-1,4-ксиланазы

Для определения эндоглюканазной (КМЦ-азной) и ксиланазной активности использовали метод, основанный на измерении скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС) методом Шомоди–Нельсона при гидролизе полисахаридных субстратов – β-глюкана ячменя, КМЦ и ксилана из древесины бука соответственно. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль ВС за 1 мин при рН 5,0 и 50 °С [21].

Результаты и обсуждение

С помощью методов генетической инженерии были созданы плазмиды, содержащие один или два целевых гена (*phyA* и/или *eglIII* и *xylE*).

Проведена трансформация штамма реципиента *P. verruculosum* с последующим отбором наилучших трансформатов согласно критерию наибольшей активности по отношению к фитату натрия, КМЦ и ксилану. Таким образом, были отобраны два наиболее активных продуцента ферментов, а на их основе получены два сухих ФП.

Исследование сухих ФП, полученных на основе новых штаммов *P. verruculosum* PV-Phy-EG и PV-Phy-Xyl с помощью ЭФ-ПААГ (рис. 2, 3), показало, что по сравнению с ФП на основе контрольного штамма реципиента В-537 для рекомбинантных ФП наблюдается заметное увеличение белковых полос в районе 63, 37 и 40 кДа (соответствующих, как предполагалось, фитазе А, эндо-1,4-β-глюканазе II и эндо-1,4-β-ксилазазе Е). Эти белковые полосы были вырезаны из геля и обработаны трипсином. Полученные гидролизаты исследованы с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Было установлено, что полосы на электрофореграмме (рис. 2), соответствующие 63, 37 и 40 кДа принадлежат целевым ферментам – фитазе А, эндо-1,4-β-глюканазе II и эндо-1,4-β-ксилазазе Е.

Следует отметить, что фитаза А и эндо-1,4-β-глюканазе II, а также фитаза А и эндо-1,4-β-ксилазазе Е являлись «мажорными» компонентами рекомбинантных ФП PV-Phy-EG и PV-Phy-Xyl по сравнению с контрольным ФП PV-контроль, полученным с помощью штамма-реципиента (рис. 2), при этом в полученных рекомбинантных ФП присутствовали также и ферменты исходного ферментного комплекса, продуцируемого реципиентным штаммом В1-537 (табл. 1). ФП PV-Phy-EG содержал 25% рекомбинантной фитазы А, а содержание ЭГ II было почти в 5 раз больше по сравнению с содержанием в исходном штамме (14 и 3% соответственно). ФП PV-Phy-Xyl содержал 44% рекомбинантных белков с своем составе, а именно: 9% фитазы А *A. niger* и 36% эндо-1,4-β-ксилазазе Е *P. canescens*.

Активность полученных новых ФП была определена по отношению к растворимым полисахаридным субстратам – КМЦ, β-глюкану, ксилану и фитату натрия (табл. 2). Оба ФП обладали высокой фитазной активностью (от 24 000 до 34 000 ед./г) по сравнению с контрольным

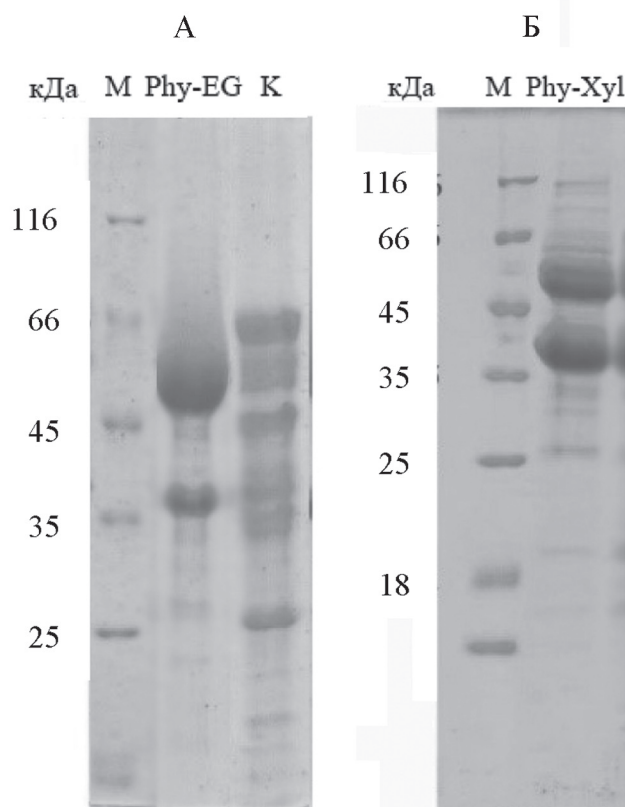


Рис. 2. Электрофореграммы полученных ферментных препаратов *P. verruculosum*: PV-Phy-EG (А) и PV-Phy-Xyl (Б), К – контрольный ФП на основе исходного штамма, М – белковый маркер

Т а б л и ц а 1

Содержание целевых белков в сухих ФП, %

Ферментный препарат	Фитаза А, <i>A. niger</i>	ЭГ II, <i>P. verruculosum</i>	Ксиланаза Е, <i>P. canescens</i>	Другие белки
PV-Phy-EG	25	14	–	61
PV-Phy-Xyl	9	2	36	53
PV-контроль	–	3	–	97

Т а б л и ц а 2

Активность (ед./г) по отношению к разным субстратам и содержание белка (мг/г) в ФП, полученных с помощью рекомбинантных штаммов-продуцентов и штамма-реципиента *P. verruculosum* 537 *niaD*

Ферментный препарат	Белок, мг/г	КМЦ ед./г	β -Глюкан, ед./г	Ксилан, ед./г	Фитат, ед./г
PV-Phy-EG	694 \pm 21	3105\pm93	2837\pm104	5621 \pm 169	43134\pm1294
PV-Phy-Xyl	638 \pm 19	663 \pm 20	663 \pm 20	18996\pm570	31208\pm936
PV-Phy-EG-Xyl	605 \pm 17	3361\pm118	3020\pm90	14540\pm436	39461\pm1183
PV-контроль	850 \pm 20	7150 \pm 150	5230 \pm 110	12600 \pm 900	–

ФП, не обладающим фитазной активностью. Значения общей активности по отношению к КМЦ и β -глюкану новых ФП различались. Для ФП PV-Phy-EG эти показатели были выше, чем для контрольного ФП, а в случае ФП PV-Phy-Xyl они были существенно ниже контроля, что согласуется с ферментным составом ФП, представленным в табл. 1.

Общая ксиланазная активность для ФП PV-Phy-Xyl с рекомбинантной ксиланазой была в 1,5 раза выше, чем у контрольного ФП, но ксиланазная активность ФП PV-Phy-EG была ниже контроля, что также согласуется с составом ФП (табл. 1). Поскольку активность по отношению к КМЦ и β -глюкану характеризует эндоглюканазную активность, а по отношению к кси-

лану – ксиланазную, то приведенные в табл. 2 данные свидетельствуют о возрастании содержания в новых ФП соответствующих целевых экспрессируемых ферментов.

Для получения ферментных препаратов, содержащих три рекомбинантных фермента было необходимо создать штамм-реципиент на основе полученного дуплета. Для этого был выбран штамм, продуцирующий рекомбинантные фитазу и эндо-1,4- β -глюканазу – PV-Phy-EG (PhyEG36). Для этого был применен современный метод геномного редактирования CRISPR/CAS, адаптированный нами ранее для создания реципиентных штаммов [16]. Был осуществлен дизайн направляющей РНК для гена *niaD* *Aspergillus niger*, поскольку

	protospacer	PAM
<i>AnniaD</i>	tttcctcaaaggcttcgcactccgtaggatatctgc	
Клон 1	tttcctcaaaggcttcgcac-ccgtaggatatctgc	
Клон 3	tttcctcaaaggcttcgcac-ccgtaggatatctgc	
Клон 4	tttcctcaaaggcttcgcactaccgtaggatatctg	

Рис. 3. Выравнивание фрагментов гена *AnniaD*, содержащих мутации в районе протоспейсера, у клонов, отобранных после трансформации плазмидой pGCS

схема трансформации исходного штамма *P. verruculosum* 537, используемого для получения «дуплетных» вариантов PhyEG и PhyXyl предполагала использование плазмиды pSTA10 с геном нативной нитратредуктазы *A. niger* для восстановления протототрофности штамма после трансформации.

После трансформации штамма *P. verruculosum* PhyEG36 по описанной выше методике было получено около тридцати колоний, не способных к росту на МС с нитратом натрия в качестве источника азота. Девять трансформантов были проверены на наличие мутации в рекомбинантном гене *Annia D*. В результате в трех случаях были обнаружены мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания (рис. 3). Таким образом, нами был получен штамм-реципиент, экспрессирующий рекомбинантные фитазу и

эндо-1,4-β-глюканазу для последующего использования в получении многокомпонентных ферментных комплексов.

На основе нового реципиентного штамма *P. verruculosum* PhyEG36 *ΔniaD* с помощью метода плазмидной трансформации был получен штамм-продуцент трех рекомбинантных ферментов PV-Phy-EG-Xyl, продуцирующий одновременно фитазу, эндо-1,4-β-глюканазу и эндо-1,4-β-ксилазу. Показано, что новый штамм обладает целевой активностью по отношению к ксилану бука, КМЦ, β-глюкану ячменя и фитату натрия (табл. 2). В дальнейшем планируется проведение прикладных экспериментов, включающих опытные испытания новых комплексных ферментных препаратов на основе новых штаммов в кормлении моногастрических животных и птицы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bautil A., Verspreet J., Buysse J., Goos P., Bedford M.R., Courtin C.M. // *Poult Sci.* 2020. Vol. 99. N 5. P. 2555–2565 (DOI: 10.1016/j.psj.2019.12.041).
2. Гильмуллина Л.Ф., Пономарева М.Л., Пономарев С.Н., Маннапова Г.С. // *Химия растительного сырья.* 2021. № 1. С. 27–43.
3. Bohn L., Meyer A.S., Rasmussen S.K. // *J. Zheijang Univ. Sci.* 2008. V. 9. P. 165–191.
4. Сеницына О.А., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Серебряный В.А., Вавилова Е.А., Винецкий Ю.П., Сеницын А.П. // *Биохимия* 2003. Т. 68. Вып. 12. С. 1631–1638.
5. Сеницын А.П., Зоров И.Н., Короткова О.Г., Мерзлов Д.А. // *Птицеводство.* 2016. № 1. С. 19–24.
6. Денисенко Ю.А., Мерзлов Д.А., Гусаков А.В., Чекушина А.В., Сеницын А.П. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2015. Т. 56. № 6. С. 348.
7. Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M. et al. // *J. Biotechnol.* 2010. Vol. 5. P. 871.
8. Wyss M., Brugger R., Kroneneberger A., Remy R., Fimbel R., Oesterhelt G., Lehmann M., van Loon A.P.G.M. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. Vol. 65. P. 367–373.
9. Пат. РФ 2378372 С2, опубл. 10.01.2010. Бюл. № 1.
10. Сеницын А.П., Сеницына О.А., Зоров И.Н., Рожкова А.М. // *Прикл. биохим. микробиол.* 2020. Т. 56. № 6. С. 551–560.
11. Dandan Li, Yu Tang, Jun Lin and Weiwen Cai Methods for genetic transformation of filamentous fungi // *Microb Cell Fact.* 2017. Vol. 16. P. 168.
12. Ruiz-Diez B. // *J. Appl. Microb.* 2002. Vol. 92. P. 189–295.
13. Aslanidis C., de Jong, P.J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR) // *Nucleic Acids Res.* 1990. Vol. 18. P. 6069–6074 (DOI: 10.1093/nar/18.20.6069).
14. Proteome Research: Mass Spectrometry – Principles and Practice. Ed. James P. Heidelberg, 2001.
15. Gusakov A.V., Semenova M.V., Sinitsyn A.P. // *J. Anal. Chem.* 2010. Vol. 65. N 14. P. 1446–1461.
16. Kislitsin V.Yu., Chulkin A.M., Zorov I.N., Denisenko Y.A., Sinitsyn A.P., Rozhkova A.M. // *Biores. Technol. Rep.* 2022. Vol. 18. P. 1010–1023.
17. Aleksenko A., Makarova N., Nikolaev I., Clutterbuck A. // *Curr. Genet.* 1995. Vol. 28. P. 474–478.
18. Kislitsin V.Yu., Chulkin A.M., Zorov I.N., Denisenko Y.A., Sinitsyn A.P., Rozhkova A.M. // *Biores. Technol. Rep.* 2022. Vol. 18. P. 101023.
19. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика // М., 1991. С. 544.
20. Engelen A.J., van der Heeft F., Randsdorp P.H., Smit E.L. // *J. AOAC Int.* 1994. Vol. 77. P. 760–764.
21. Сеницын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.А. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов // М., 1995. 144 с.

Информация об авторах

Короткова Ольга Генриховна – науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук, littletempo@yandex.ru;

Рожкова Александра Михайловна – ст. науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук, amrojkova@yahoo.com;

Кислицин Валерий Юрьевич – мл. науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, аспирант, kislitsin.val@gmail.com;

Синицына Ольга Аркадьевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук, oasinityna@gmail.com;

Денисенко Юрий Андреевич – науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук, denisenkoyura@mail.ru;

Марочкина Мария Михайловна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, marochkinamasha@yandex.ru;

Зоров Иван Никитич – ст. науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук, inzorov@mail.ru;

Шашков Игорь Александрович – науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук, igorshashkov@bk.ru;

Сатругдинов Айдар Дамирович – науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. биол. наук, sat-aidar@mail.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, apsinityn@gmail.com.

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 05.09.2022;
одобрена после рецензирования 12.10.2022;
принята к публикации 14.10.2022.