БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 6, с. 840 – 848

УДК 577.152.321:577.114.4:57.083.13

СОЗДАНИЕ ПРОДУЦЕНТА ХИТИНАЗЫ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЕЁ ПРЕПАРАТА ДЛЯ РАЗРУШЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

© 2020 О.А. Синицына[1]*, Е.А. Рубцова[2], И.Г. Синельников[2], Д.О. Осипов[2], А.М. Рожкова[2], В.Ю. Матыс[3], Т.В. Бубнова[3], В.А. Немашкалов[3], А.С. Середа[4], Л.А. Щербакова[5], А.П. Синицын[1,2]

[1] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: oasinitsyna@gmail.com*

[2] *ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Россия*

[3] *ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия*

[4] *ВНИИ пищевой биотехнологии филиала ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи, 111033 Москва, Россия*

[5] *Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, 143050 Большие Вязёмы Московской обл., Россия*

Поступила в редакцию 16.04.2020
После доработки 18.04.2020
Принята к публикации 18.04.2020

На основе гриба *Penicillium verruculosum* создан рекомбинантный штамм, комплекс внеклеточных ферментов которого содержит хитиназу *Myceliophtora thermophila*. Активность ферментных препаратов, полученных из культуральной жидкости штамма-продуцента, достигала 0,55, 0,53 и 0,66 ед/мг белка по хитину и хитозанам с мол. массой 200 и 1000 кДа соответственно. Оптимумы температуры и pH рекомбинантной хитиназы составили 52–65 °C и pH 4,5–6,2, что соответствует литературным данным для ферментов этого класса. Содержание гетерологичной хитиназы в исследованных ферментных препаратах составило 47% от общего содержания белка в культуральной жидкости. Показано, что новые ферментные препараты, полученные на основе рекомбинантного штамма *Penicillium verruculosum* XT403 и содержащие гетерологичную хитиназу, способны разрушать мицелий микроскопических, в том числе фитопатогенных грибов, и весьма эффективны в процессах биоконверсии отходов микробиологической промышленности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хитиназа, хитин, хитозан, *Penicillium verruculosum*, фитопатогенные грибы, биоконверсия отходов.

DOI: 10.31857/S0320972520060093

ВВЕДЕНИЕ

Хитиназа (ХТ, эндо-1,4-β-поли-*N*-ацетилглюкозаминидаза) является ключевым ферментом, ответственным за деструкцию хитина и хитозана (линейных гомополимеров 1,4-β-*N*-ацетил-*D*-глюкозамина). ХТ эффективно расщепляет гликозидные связи хитина и хитозана вблизи остатков *N*-ацетилглюкозамина (через один углеводный остаток), поэтому её активность сильно зависит от степени деацетилирования (СД) субстрата [1].

В настоящее время в биотехнологии существует ряд направлений, в которых используются хитинолитические ферменты. В последнее время интенсивно разрабатываются подходы к применению этих ферментов для биохимической трансформации хитина в биологически активные хитоолигосахариды, обладающие противомикробной (антигрибной и антибактериальной), элиситорной, ростостимулирующей, противоопухолевой и противовоспалительной активностями [1–4]. Кроме того, сами мономеры хитина – *N*-ацетилглюкозамин и *D*-глюкозамин – также являются физиологически активными веществами [5–7]. Другое современное направление использования хитиназ – это конверсия отходов хитин-содержащего сырья в микробную и дрожжевую биомассу, белок и биотопливо [8–11]. Хитиназы играют ключевую

Принятые сокращения: ХТ – хитиназа, ФП – ферментный препарат, КЖ – культуральная жидкость, СД – степень деацетилирования, ЦБГI – целлобиогидролаза I, ЭГ – эндоглюканаза, КСИЛ – ксиланаза.

* Адресат для корреспонденции.

роль в комплексе гидролаз, лизирующих клеточную стенку грибов, и являются эффективным инструментом для выделения протопластов грибных клеток [12, 13].

Хитинолитические ферменты имеют фунгицидную, инсектицидную и антипаразитарную (нематицидную) активности и привлекательны с практической точки зрения для использования их в качестве биопестицидов, которые могли бы заменить химические пестициды, массово используемые как в открытом грунте, так и в парниках [4]. Во всех этих случаях функция ферментов заключается в разрушении хитина, входящего в состав клеточной стенки или структурных элементов микроорганизмов, экзоскелета насекомых и оболочки яиц паразитов. Важную роль хитинолитические ферменты играют как антимикробные агенты при борьбе с грибной и бактериальной контаминацией пищевых и сельскохозяйственных продуктов [14].

Мицелиальные грибы занимают лидирующую позицию в качестве объектов биотехнологического производства благодаря высокой продуктивности при культивировании на дешевых производственных средах и способности к синтезу широкого круга ферментов и таких метаболитов, как антибиотики, витамины и органические кислоты. Однако в процессе ферментации в качестве отхода образуется большое количество грибного мицелия – например, в результате производства лимонной кислоты с помощью штамма *Aspergillus niger* в мире образуется до 0,34 млн т мицелия в год [15]. Грибная биомасса не подлежит длительному хранению и служит источником загрязнения окружающей среды; наиболее распространенным способом её утилизации является сжигание [3, 16]. Хитин является структурно важным компонентом грибной клеточной стенки, его содержание различно у грибов разных таксонов и составляет в зависимости от систематического положения организма и условий культивирования от 0,2 до 26% от сухой массы [17]. Весьма перспективным представляется способ ферментативной деструкции полисахаридов клеточной стенки мицелиальных грибов, в первую очередь хитина, который позволяет осуществить экологически и экономически оправданный процесс переработки биомассы грибного мицелия как отхода микробиологической промышленности с получением биологически ценных компонентов в легкоусвояемой форме [18].

Вышесказанное делает очевидным необходимость создания высокоактивных штаммов-продуцентов, которые позволят осуществить промышленное производство хитинолитических ферментов. Целью работы является создание продуцента ХТ на основе реципиентного штамма *Penicillium verruculosum* 537 (Δ*niaD*), обладающего высокой секреторной способностью (до 50–60 г/л внеклеточного белка), в котором редуцирована репрессия катаболизма глюкозы [19–21], и использование полученного ферментного препарата (ФП) для разрушения клеточной стенки микроскопических грибов. В качестве кандидата на клонирование была выбрана хитиназа *Myceliophtora thermophyla* (ранее *Chrysosporium lucknowense*), поскольку известно, что ферменты этого аскомицета обладают широким pH- и температурным оптимумом активности, что существенно облегчает их практическое применение [22, 23].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. Для приготовления ПААГ-гелей и буферных растворов использовали реагенты фирмы «Bio-Rad» (США), «MP Biochemicals Inc.» (Франция), «Ferak» (Германия) и «Реахим» (Россия). ПААГ-гели окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R-250B, а в качестве маркёров для определения мол. массы белков использовали набор MW-SDS 200 (10–200 кДа) («ThermoScientific», США). В качестве калибровочного стандарта при определении концентрации белков в растворе методом Лоури и др. использовали БСА («БелНИИЭМ», Белоруссия).

Субстраты. В качестве субстратов при определении ферментативных активностей использовали натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), берёзовый ксилан («Sigma-Aldrich», США) и микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ) («МКЦ Центр», Россия). Хитозан с мол. массой 1000 кДа и СД 85%, хитозан с мол. массой 200 кДа и СД 87%, а также коллоидный хитин из краба были предоставлены проф. В.П. Варламовым (ФИЦ «Биотехнология» РАН).

Получение штамма *P. verruculosum* – продуцента хитиназы. В качестве реципиентного использовали штамм *P. verruculosum* B1-537 (Δ*niaD*), дефектный по гену *niaD*. Штамм *Escherichia coli* Mach-1 (ΔrecA1398 endA1 tonA Φ80ΔlacM15 ΔlacX74 hsdR($r_K^-m_K^+$)) («Invitrogen», США) был использован для клонирования целевых генов, получения и выделения плазмид.

Плазмида. В составе использованной в работе экспрессионной плазмиды pChi403 целевой ген *chi403* (GenBank: XM_0036663496), кодирующий хитиназу *M. thermophila*, находился под контролем гомологичного промотора гена *cbh1*, кодирующего целлобиогидролазу 1 (ЦБГ1) *P. verruculosum* [23].

Плазмида pChi403 была получена согласно методу, основанному на амплификации гена *chi403* методом ПЦР с использованием геномной ДНК штамма *M. thermophila* в качестве матрицы и пары олигонуклеотидов [24]:

(Chi403-LIC) 5'-CAAACAGAAGCAACCGACACAATGGGCGGCGGACCTACGGA,

(Chi403-LIC) 3'-GAGGAGAAGCCCGGTCTAATTGTTCGGGAATCCCTCCCTCA.

Клонирование полученного ПЦР-продукта в вектор pUC-CBH обеспечивало экспрессию целевого гена *chi403* за счёт стабильного интегративного встраивания в хромосому гриба *P. verruculosum* с использованием сайтов независимого лигирования [25].

Трансформация штамма-реципиента. Рекомбинантные штаммы серии XT403 были получены в результате трансформации штамма-реципиента *P. verruculosum* B1-537 (Δ*niaD*) плазмидой pChi403 [23].

Стандартные процедуры выделения геномной ДНК, выделение ПЦР-продуктов из агарозного геля, а также выделение плазмидной ДНК осуществляли с помощью наборов фирмы «Qiagen» (США) по методикам производителя. ПЦР проводили с использованием набора Long Polimerase Mix («ThermoScientific», США) на приборе MyCycler («Bio-Rad», США) по следующей схеме: 94 °C – 3,5 мин – 1 цикл; 94 °C – 30 с, 50 °C – 2 мин, 72 °C – 1 мин – 30 циклов; 72°C – 10 мин, 4 °C – 25 мин.

Культивирование штаммов. Штаммы *P. verruculosum* XT403 выращивали на качалках в колбах Эрленмейера ёмкостью 750 мл в 100 мл ферментационной среды следующего состава (%): KH_2PO_4 – 1,5, $(NH_4)_2SO_4 \times 7H_2O$ – 0,5, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,03, $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 0,03, глюкоза –1,0, дрожжевой экстракт–1,0, пшеничные отруби–1,0, МКЦ – 4,0. После культивирования в течение 6 сут на качалке при 220 об/мин и 30 °C КЖ отделяли от мицелия центрифугированием в течение 10 мин при 10 700 g. В КЖ определяли концентрацию белка и соответствующие активности по отношению к коллоидному хитину, хитозанам, КМЦ и ксилану.

Получение биомассы мицелиальных грибов для разрушения хитиназой. Штамм *Aspergillus awamori* M2002 (BKM F-3771D) культивировали в колбах в течение 6 сут при 35 °C в ферментационной среде, содержавшей 24% пшеничной муки, обработанной термостабильной α-амилазой. Штамм *Penicillium canescens* Pep-4 (BKM F-4677D) культивировали в колбах в течение 7 сут при 30 °C в среде, в состав которой входили (%): соевая шелуха – 4,5, кукурузный экстракт – 5,0, KH_2PO_4 – 2,5.

Биомассу мицелиальных грибов *Fusarium culmorum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium graminearum* получали путем их глубинного культивирования в среде Чапека, на картофельно-глюкозной среде (*Stagonospora nodorum*, *Septoria tritici*) или среде Пайна–Хэглера (*Aspergillus flavus*) при 220 об/мин и 25–26 °C в течение 7 сут (*Fusarium* spp., *A. flavus*) или 10–12 сут (*St. nodorum*, *S. tritici*). Все штаммы, использованные в данной части работы, были из Государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов и сортов растений-идентификаторов патогенных штаммов микроорганизмов на базе ВНИИФ (Большие Вязёмы, Московская обл.).

В конце ферментации грибную биомассу отделяли фильтрованием через нетканый материал.

Получение ФП. Культивирование отобранных в качалочных колбах рекомбинантных (и реципиентного) штаммов *P. verruculosum* осуществляли в ферментационной установке КФ-108 на ферментёрах с рабочим объёмом 1 л в ИБФМ РАН (г. Пущино) в течение 6–7 сут, используя ферментационную среду следующего состава (%): KH_2PO_4 – 0,7, $(NH_4)_2SO_4 \times 7H_2O$ – 0,5, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,03, $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 0,023, глюкоза – 4,0, дрожжевой экстракт – 1,0, пшеничные отруби – 1,0, МКЦ – 4,0; pH не ниже 4,5, температура 32,0 ± 0,5 °C, аэрация 1 л/л/мин. После окончания процесса культивирования КЖ отделяли от мицелия гриба-продуцента центрифугированием и подвергали лиофильному высушиванию на распылительной сушилке Mini Spray Dryer B-290 («Buchi», Швейцария).

Определение ферментативных активностей. Активность по отношению к полисахаридным субстратам (хитозанам, КМЦ, МКЦ, ксилану) измеряли по начальным скоростям образования восстанавливающих сахаров (ВС) при 50 °C, pH 5,0 (0,1 M Na-ацетатный буфер) при исходной концентрации субстрата 5 г/л. ВС определяли модифицированным методом Шомоди–Нельсона [26–28] или с использованием бицинхонинатного метода (для фракций после хроматографического фракционирования [29]). За единицу активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль ВС за 1 мин.

Активность по отношению к коллоидному хитину определяли двумя способами: модифицированным феррицианидным методом [30] или по уменьшению светопоглощения суспензии хитина при 700 нм [31]. При использовании феррицианидного метода измеряли начальную скорость образования ВС (глюкозамина) при 50 °C, pH 5,0 (Na-ацетатный буфер); за единицу активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль ВС (глюкозамина) за 1 мин. Согласно

второй методике, реакцию проводили при 37 °C, pH 5,0 (Na-ацетатный буфер), за единицу хитиназной активности принимали уменьшение светопоглощения суспензии на 1% от начального её значения на длине волны 700 нм.

Определение концентрации белка. Содержание белка в КЖ и ФП определяли модифицированным методом Лоури и др. [32], используя в качестве стандарта БСА. Содержание белка в хроматографических фракциях определяли по светопоглощению при 280 нм, считая средний коэффициент экстинкции белка равным 2,0.

Электрофорез в ПААГ. Электрофорез в 12%-ном ПААГ с Ds-Na проводили на приборе MiniProtein («Bio-Rad», США) согласно руководству к прибору.

Хроматографическое фракционирование ФП. Анализ состава ФП проводили по схеме, включавшей три стадии: предварительную очистку ФП, анионообменную и гидрофобную хроматографию. Раствор ФП осаждали $(NH_4)_2SO_4$ (80% от насыщения при 25 °C), перерастворяли в 0,02 М бис-Tris-HCl буфере, pH 6,8 и обессоливали на колонке с биогелем P-4, уравновешенной с тем же буфером. Последующие стадии проводили на жидкостном хроматографе NGC Chromatography System («Bio Rad», США). Для анионообменной хроматографии обессоленного ФП использовали колонку с носителем Source 15Q («Pharmacia», Швеция), уравновешенную со стартовым буфером 0,02 М бис-Tris-HCl, pH 6,8. Элюирование белков вели в линейном градиенте концентраций NaCl от 0 до 0,4 М. В полученных фракциях значение pH доводили до 5,0 с помощью 1,0 М Na-ацетатного буфера, pH 5,0. Фракции, содержавшие целевые ферменты, подвергали гидрофобной хроматографии на колонке с носителем Source 15 Isopropyl (объём геля 1 мл, «Pharmacia», Швеция), уравновешенной с 1,7 М раствором $(NH_4)_2SO_4$ в 0,05 М Na-ацетатном буфере, pH 5,0. Элюирование белков вели в линейном градиенте концентраций $(NH_4)_2SO_4$ от 1,7 до 0 М.

В полученных фракциях определяли содержание белка и активность ферментов по отношению к различным субстратам. Кроме того, все фракции исследовали методом электрофореза в ПААГ с Ds-Na.

Определение состава ФП. Для определения качественного состава ФП сопоставляли данные по активности хроматографических фракций по отношению к различным субстратам и результаты их электрофоретического анализа. Количественный состав исследуемого ФП был рассчитан как отношение количества фермента в гомогенной фракции к суммарному количеству белка в исследуемом образце. Кроме того, содержание индивидуальных ферментов в ФП определяли, анализируя данные электрофореза в ПААГ с Ds-Na с помощью денситометрии, используя программное обеспечение «Gel Analyser».

Деструкция грибной биомассы. Гидролиз биомассы глубинного мицелия грибов *A. awamori*, *P. canescens*, *F culmorum, F. sambucinum*, *F. graminearum*, *St. nodorum*, *S. tritici* и *A. flavus* (расшифровано выше, см. раздел «Получение биомассы мицелиальных грибов для разрушения хитиназой») проводили в стеклянных градуированных пробирках объемом 10 мл с притертыми пробками в течение 24, 36 или 48 ч при гидромодуле 1 : 10 (1 г сырого мицелия на 10 мл дистиллированной воды) при температуре 25–27 °C без перемешивания. ФП вносили в дозировке 10 мг белка на 1 г сырого мицелия, а результат их действия на грибную биомассу оценивали визуально, измеряя объем оставшегося осадка по градуированной шкале пробирки, а также с помощью микроскопирования, используя лабораторный микроскоп Eclipse Ci («Nikon Corporation», Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение продуцентов хитиназы. Ген *chi403* (GenBank AN: NC_016476), кодирующий ХТ *M. thermophile*, которая относится к семейству гликозил-гидролаз GH18, был клонирован в вектор pUC-CBHI, который обеспечивает экспрессию целевых генов в реципиентном штамме *P. verruculosum* B1-537 (Δ*niaD*) под контролем индуцибельного промотора *cbh1*, кодирующего ЦБГ1.

В результате клонирования была получена плазмида pChi403, экспрессионная кассета которой схематично представлена на рис. 1. Плазмида pChi403 состояла из гомологичного промотора и терминатора гена *cbh1* гриба *P. verruculosum* и гетерологичного гена *chi403*, для секреции ХТ был использован гомологичный сигнальный пептид ЦБГI.

Реципиентный штамм *P. verruculosum* B1-537 (Δ*niaD*) был котрансформирован 10 мкг плазмиды pChi403 совместно с 1 мкг плазмиды pSTA10 (niaD). В результате были получены ~250 трансформантов серии ХТ403, что соответствует средней трансформационной частоте мицелиальных грибов [33]. Далее случайным образом выбраны 10 трансформантов, которые были перенесены на минимальную селективную среду [23], а затем проанализированы методом ПЦР на наличие целевого гена с использованием олигонуклеотидов для его амплификации. Все анализируемые трансформанты содержали гетерологичный ген *chi403*.

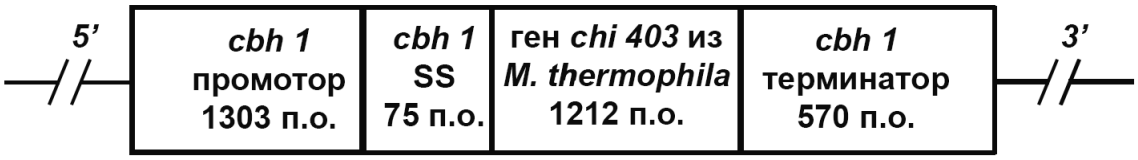

Рис. 1. Схематическое изображение экспрессионной кассеты в плазмиде pChi403 с геном *chi403*, кодирующим ХТ GH18 *M. thermophila*

Отобранные трансформанты культивировали в качалочных колбах. После завершения ферментации в КЖ определяли концентрацию белка и ферментативную активность по отношению к коллоидному хитину, хитозанам с мол. массой 200 и 1000 кДа, КМЦ и ксилану. В качестве контроля использовали КЖ реципиентного штамма *P. verruculosum* B1-537 (Δ*niaD*). По результатам измерений был отобран трансформант Chi403-4, обладавший максимальной активностью ХТ (данные не приведены). Этот трансформант далее культивировали в 1-литровых ферментёрах, и, в конечном итоге, был получен препарат ФП ХТ403-4, представлявший собой лиофильно высушенную КЖ.

Активность рекомбинантного ФП. В полученном ФП ХТ403-4 было определено содержание белка и активность по отношению к различным субстратам (табл. 1). В качестве контроля использовали ФП из КЖ реципиентного штамма *P. verruculosum* B1-537 (Δ*niaD*). Удельная активность ФП ХТ403-4 по отношению к хитозанам 200 и 1000 кДа составила 0,53 и 0,66 ед/мг белка соответственно, по отношению к коллоидному хитину – 0,55 ед/мг. Активность контрольного ФП по отношению к хитозанам с мол. массой 200 и 1000 кДа и хитину составила 0,04, 0,04 и 0,05 ед/мг соответственно.

Удельная активность рекомбинантного ФП ХТ403-4 по отношению к МКЦ, отражающая целлобиогидролазную активность, снижалась в 2,7 раза по сравнению с контролем, что, вероятно, связано с недостатком положительных факторов транскрипции в рекомбинантном штамме [34].

Удельная активность эндоглюканазы (ЭГ) по КМЦ и ксиланазы (КСИЛ) по березовому ксилану рекомбинантного ФП ХТ403-4 также снизилась – в 6,2 и 9,4 раза, соответственно, по сравнению с контролем.

Таблица 1. Удельная активность ФП по отношению к различным субстратам

Ферментный препарат	Содержание белка, мг/г	Удельная активность, уд/мг					
		ХТЗ 200 кДа*	ХТЗ 1000 кДа**	КХТ***	МКЦ	КМЦ	Ксилан
ХТ403-4	300 ± 16	0,53 ± 0,02	0,66 ± 0,02	0,55 ± 0,02	0,22 ± 0,01	1,70 ± 0,07	1,80 ± 0,07
Контроль	680 ± 25	0,040 ± 0,003	0,040 ± 0,003	0,050 ± 0,003	0,61 ± 0,02	10,6 ± 0,2	16,9 ± 0,3

* Хитозан 200 кДа.
** Хитозан 1000 кДа.
*** Коллоидный хитин.

Таблица 2. Компонентный состав ФП

Ферментный препарат	Содержание фермента, % общего белка				
	ХТ	ЦБГ	ЭГ	КСИЛ	Другие
ФП ХТ403-4	47	26	1	2	24
Контроль	0	60	12	3	25

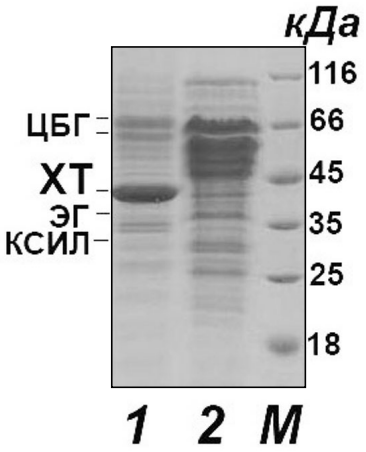

Рис. 2. Электрофорез в ПААГ в присутствии Ds-Na. *1* – ФП ХТ403-4; *2* – контрольный ФП, полученный с помощью реципиентного штамма B1-537 (Δ*niaD*)

Состав рекомбинантного ФП. На рис. 2 представлены результаты анализа рекомбинантного ФП с помощью электрофореза в ПААГ с Ds-Na. Видно, что его электрофореграмма отличается от контрольного ФП наличием хорошо выраженной новой полосы в области 43 кДа, соответствующей гетерологичной ХТ, и заметным уменьшением площади полос, соответствующих ЦБГ1 (66 кДа), ЭГ2 (39 кДа) и КСИЛ (32 кДа).

Изучение компонентного состава рекомбинантного ФП ХТ403-4 проводили путем хроматографического фракционирования. Очищенный от низкомолекулярных веществ с помощью гель-фильтрации ФП ХТ403-4 подвергали анионообменной хроматографии на колонке с носителем Source 15Q при pH 6,8. Фракции, содержавшие ХТ, подвергали гидрофобной хроматографии на колонке с носителем Source 15 Isopropyl. Во всех случаях в элюенте определяли содержание белка и активность ферментов по отношению к хитозанам, хитину, КМЦ, МКЦ и ксилану. Кроме того, все фракции анализировали методом электрофореза в ПААГ с Ds-Na. На основании полученных данных было рассчитано содержание основных компонентов исследуемого ФП (табл. 2). Количество гетерологичной ХТ в нём составило 47% от общего содержания белка. Содержание ЦБГI в ФП ХТ403-4 снизилось в 2,3 раза по сравнению с контролем, что согласуется со снижением удельной активности по отношению к МКЦ (табл. 1). В рекомбинантном ФП ХТ403-4 наблюдали также снижение содержания ЭГ и КСИЛ, что соответствовало снижению их удельной активности по отношению к соответствующим специфическим субстратам.

Термостабильность, pH и температурные оптимумы ФП ХТ. Были определены pH- и температурные оптимумы хитиназной активности рекомбинантного ФП ХТ 403-4, а также стабильность ХТ при различных температурах. Полученные результаты представлены в табл. 3. Максимальную активность ХТ проявляла при 60 °C и pH 4,7–5,5; область значений температуры и pH, в которой ХТ проявляла 80% активности от максимальной, составила 52–65 °C и 4,5–6,2, что соответствует описанным в литературе для ферментов этого класса [1]. ХТ обладала достаточно высокой стабильностью в водном растворе к продолжительному воздействию повышенных температур (в растворе): за 3 ч инкубации при 40 и 50 °C (pH 5) она сохраняла 90 и 83% исходной активности соответственно (табл. 3).

Применение ФП ХТ для разрушения грибного мицелия. В качестве источника грибного мицелия использовали *A. awamori* – промышленный продуцент глюкоамилазы, а также *P. canescens* – промышленный продуцент протеаз. Для проведения деструкции мицелия использовали ФП ХТ403-4 в дозировке 10 мг белка на 1 г сырой биомассы грибов. Остаточный объём биомассы мицелия *A. awamori* после 24 ч под действием препарата ХТ403-4 уменьшался в 2,2 раза, *P. canescens* – ~ в 2 раза (рис. 3). ФП, полученный с помощью реципентного штамма B1-537 (Δ*niaD*), обладающий в основном только целлю-

Таблица 3. Биохимические характеристики ферментного препарата ФП ХТ 403-4 (определены при использовании коллоидного хитина в качестве субстрата)

Измеряемый параметр	Значение параметра
pH-оптимум активности	4,7–5,5
pH-диапазон активности ≥80%	4,5–6,2
pH-диапазон активности ≥50%	3,7–6,5*
Температурный оптимум активности, °C	60
Температурный диапазон активности ≥80%, °C	52–65
Температурный диапазон активности ≥50%, °C	45–75
Остаточная активность после инкубации при 40 °C (pH 5), %	90**
Остаточная активность после инкубации при 50 °C (pH 5), %	83**

* Измерение активности при значениях pH выше 6,5 для коллоидного хитина затруднительно из-за свойств субстрата.
** Активность через 3 ч инкубации.

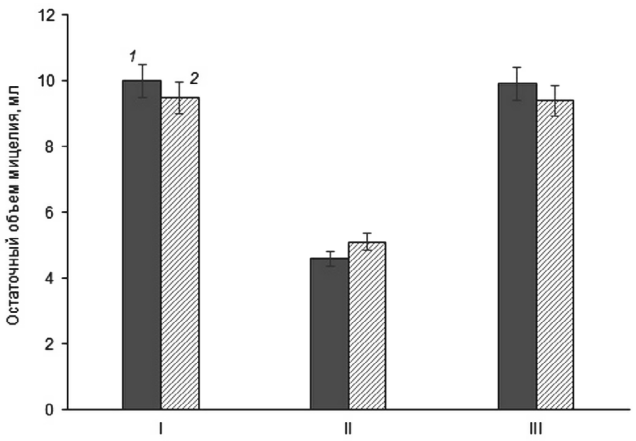

Рис. 3. Остаточный объем мицелия после 24 ч гидролиза биомассы *A. awamori (1)* и *P. canescens (2)* ферментным препаратом хитиназы: I – контроль без ФП, II – ХТ403-4, III – ФП из реципиентного штамма B1-537 (ΔniaD)

лолитической активностью (активность ХТ очень низка, см. табл. 1), никак не влиял на объём биомассы мицелия обоих штаммов (рис. 3).

Результаты, полученные с помощью анализа остаточного объёма осадка мицелия, подтверждаются данными микроскопирования (рис. 4), которые свидетельствуют о деструкции клеточной стенки *A. awamori* и *P. canescens* под действием ФП ХТ403-4.

ФП ХТ403-4 был использован для разрушения мицелия фитопатогенных грибов *F. culmorum*, *F. sambucinum*, *F. graminearum*, *St. nodorum*, *S. tritici* и *A. flavus* (условия обработки мицелия препаратом ХТ были такие же, как и использованные для обработки грибов-продуцентов ферментов). Остаточный объём биомассы мицелия перечисленных выше фитопатогенов после инкубации с ФП ХТ403-4 уменьшался в 2,3, 2,0, 2,3, 2,1, 2,2 и 2,4

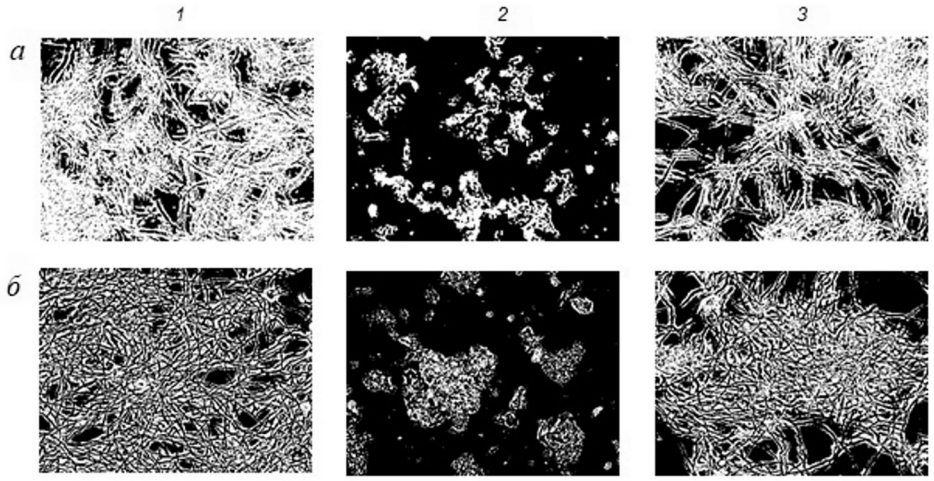

Рис. 4. Результаты микроскопирования мицелия грибов *A. awamori* (*а*) и *P. canescens* (*б*) после 24 ч гидролиза препаратом хитиназы ХТ403-4, где: *1* – мицелий без ФП; *2* – мицелий, обработанный ХТ403-4; *3* – мицелий, обработанный ФП из реципиентного штамма B1-537 (ΔniaD)

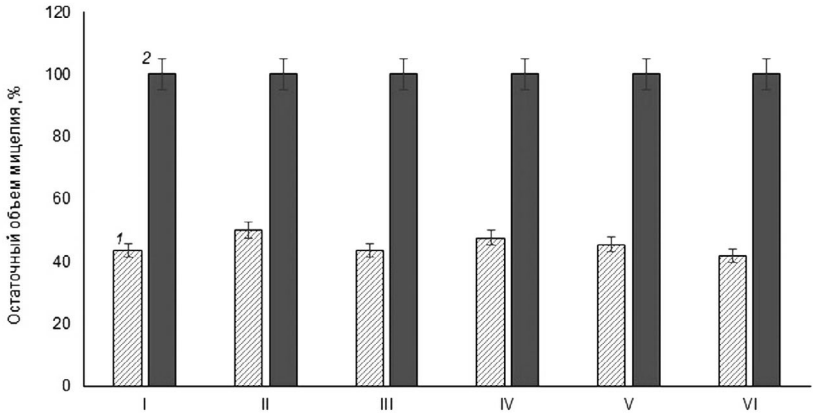

Рис. 5. Остаточный объем мицелия после 24 ч гидролиза ФП хитиназы ХТ403-4 (*1*) и ФП из реципиентного штамма B1-537 (*2*) биомассы фитопатогенных грибов, где I – *F. culmorum* , II – *F. sambucinum*, III – *F. graminearum*, IV – *St. nodorum*, V – *S. tritici* и VI – *A. flavus*

раза, соответственно, по сравнению с контролем (рис. 5). Результаты, полученные с помощью анализа остаточного объёма осадка мицелия подтверждаются микроскопированием (данные не приведены). Контрольный ФП, полученный с помощью реципиентного штамма, никак не влиял на объём биомассы мицелия фитопатогенных штаммов.

Полученные результаты показали перспективность использования ФП ХТ, полученного с помощью экспрессионной системы на базе *P. verruculosum*, для эффективной биоконверсии отходов микробиологической промышленности, а также для разрушения мицелия фитопатогенных грибов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования (уникальный идентификатор проекта: RFMEFI61620X0128).

Благодарности. В работе использовали оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» ФИЦ Биотехнологии РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мелентьев А. И., Актуганов Г. Э. (2013) В кн. *Ферменты деградации хитина и хитозана. Хитозан* (под ред. Г. К. Скрябина, С. Н. Михайлова, В. П. Варламова), центр «Биоинженерия» РАН, Москва, с. 71-114.
2. *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activity and Applications* (2011) (Kim, S.-K., ed.) CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, London, N. Y., doi: 10.1201/EBK1439816035.
3. Berini, F., Katz, C., Gruzdev, N., Casartelli, M., Tettamanti, G., and Marinelli, F. (2018) Microbial and viral chitinases: attractive biopesticides for integrated pest management, *Biotechnol. Adv.*, **36**, 818-828, doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.01.002.
4. Vijayakumar, N., and Alagar, S. (2017) Consequence of chitinase from *Trichoderma viride* integrated feed on digestive enzymes in *Corcyra cephalonica* (Stainton) and antimicrobial potential, *Biosci. Biotech. Res. Asia*, **14**, 513-519, doi: 10.13005/bbra/2473.
5. Sakai, K., Uchiyama, T., Matahira, Y., and Nanjo, F. (1991) Immobilization of chitinolytic enzymes and continuous production of *N*-acetyl *D*-glucosamine with the immobilized enzymes, *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 168-172, doi: 10.1016/0922-338X(91)90211-X.
6. Saschiwa, H., Fujishima, S., and Yamano, N. (2002) Production of *N*-acetyl D-glucosamine from alpha-chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330, *Carbohydr. Res.*, **337**, 761-763, doi: 10.1016/s0008-6215(02)00034-4.
7. Jain, T., Kumar, H., and Dutta, P. K. (2016) in *Chitin and Chitosan for Regenerative Medicine* (Dutta, P. K., ed.) Springer India, Bangalore, Mumbai, New Delhi, India, p. 279-295.
8. Wang, S.-L., Liang, T.-W., and Yen, Y.-H. (2011) Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials, *Carbohydr. Pol.*, **84**, 732-742, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.06.022.
9. Thadathil, N., and Velappan, S. P. (2014) Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: a review, *Food Chem.*, **150**, 392-399, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.083.
10. Sakai, K., Yokota, A., Kurokawa, H., Wakayama, M., and Moriguchi, M. (1998) Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3397-3402, doi: 10.1128/AEM.64.9.3397-3402.1998.
11. Revah-Moiseev, S., and Carroad, P. A. (1981) Conversion of the enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to single-cell protein, *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1067-1078, doi: 10.1002/bit.260230514.
12. Dahia, N., Tiwari, R., Tiwari, R. P., and Hoondal, G. S. (2005) Production of an antifungal chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4 and its application in protoplast production, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 1611-1615, doi: 10.1007/s11274-005-8343-6.
13. Johnson, E. A., Villa, T. G., Lewis, M. J., and Phaff, H. J. (1979) Lysis of the cell wall of yeast *Phaffia rhodozyme* by lytic complex from *Bacillus circulans* WL-12, *J. Appl. Biochem.*, **1**, 273-282.
14. *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals* (2014) (Brar, S. K., Dhillon, G. S., and Soccol, C., eds) Springer Verlag, N. Y., p. 504.
15. Камзолкина О. В., Дунаевский Я. Е. (2017) *Биология грибной клетки. Учебное пособие. 2-е изд.*, Товарищество научных изданий КМК, Москва.
16. Kuranda, M. J., and Robbins, P. W. (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **266**, 19707-19758.
17. Курченко В. П., Буга С. В., Петрашкевич Н. В., Буткевич Т. В., Ветошкин А. А., Демченков Е. Л., Лодыгин А. Д., Зуева О. Ю., Варламов В. П., Бородин О. И. (2016) Технологические основы получения хитина и хитозана из насекомых, *Труды БГУ*, **11**, 110-126.
18. Середа А. С., Великорецкая И. А., Осипов Д. О., Матыс В. Ю., Бубнова Т. В., Немашкалов В. А., Синицына О. А., Рожкова А. М., Цурикова Н. В., Синицын А. П. (2018) Ферментные комплексы для разрушения клеточной стенки мицелиальных грибов – продуцентов промышленных ферментов, *Известия Уфимского научного центра РАН*, **3**, 31-35.
19. Патент РФ 2361918.
20. Патент РФ 2378372.
21. Синицын А. П., Короткова О. Г., Рубцова Е. А., Синицына О. А., Кондратьева Е. Г., Середа А. С., Зоров И. Н., Рожкова А. М. (2019) Конструирование рекомбинантных продуцентов ферментных препаратов для кормопроизводства с помощью экспрессионной системы на основе гриба *Penicillium verruculosum*, *Биотехнология*, **35**, 6-14, doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-6-14.
22. Bukhtoyarov, F. E., Ustinov, B. B., Salanovich, T. N., Antonov, A. I., Gusakov, A. V., Okunev, O. N., and Sinitsyn, A. P. (2004) Cellulase complex of the fungus *Chrysosporium lucknowense*: isolation and characteristics of endoglucanases and cellobiohydrolases, *Biochemistry (Moscow)*, **69**, 542-551.

23. Merzlov, D. A., Zorov, I. N., Dotsenko, G. S., Denisenko, Y. A., Rozhkova, A. M., Satrutdinov, A. D., Rubtsova, E. A., Kondrat'eva, E. G., and Sinitsyn, A. P. (2015) Properties of Enzyme preparations and homogenous enzymes – endoglucanase EG2 *Penicillium verruculosum* and endoglucanase LAM *Myceliophtora thermophila*, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 473-482, doi: 10/1134/S0062979150401122
24. Semenova, M. V., Gusakov, A. V., Volkov, P. V., Matys, V. Yu., Nemashkalov, V. A., Telitsyn, V. D., Rozhkova, A. M., and Sinitsyn, A. P. (2019) Enhancement of the enzymatic cellulose saccharification by *Penicillium verruculosum* multienzyme cocktails containing homologously overexpressed lytic polysaccharide monooxygenase, *Mol. Biol. Rep.*, **46**, 2363-2370, doi: 10.1007/s11033-019-04693-y.
25. Aslanidis, C., and de Jong, J. P. (1990) Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR), *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6069-6075, doi: 10.1093/nar/18.20.6069.
26. Nelson, N. A. (1944) Photometric adoption of the Somogyi method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.*, **153**, 375-379.
27. Somogyi, M. (1952) Notes on sugar determination, *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23.
28. Sinitsyna, O. A., Bukhtoyarov, F. E., Gusakov, A. V., Okunev, O. N., Bekarevich, A. O., Vinetsky, Y. P., and Sinitsyn, A. P. (2003) Isolation and properties of major components of *Penicilium canescens extracellular enzyme complex*, *Biochemistry (Moscow)*, **68**, 1200-1209.
29. Zorov, I. N., Dubasova, M. Y., Sinitsyn, A. P., Gusakov, A. V., Mytchenko, A. A., Baraznenok, V. A., Gutierrez, B., and Popova, N. N. (1997) Application of the bicinchininic method of assay for the reducing sugars to determine carboxymethylcellulase activity of cellulases using a microplate reader, *Biochemistry (Moscow)*, **62**, 704-709, doi: 10.1134/S0006297910010062.
30. Синицын А. П., Черноглазов В. М., Гусаков А. В. (1993) *Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов. Серия «Биотехнология», 25 (Итоги науки и техники АН СССР)*, ВИНИТИ, Москва.
31. Decleire, M., De Cat, W., and Tang, V. H. (1996) in *Chitin Enzymology* (Muzzarelli, R. A. A., ed.) Atec Edizioni, Glottamare, Italy, 165-169.
32. Peterson, G. L. (1977) Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall, *Anal. Biochem.*, **100**, 201-220, doi: 10.1016/0003-2697(79)90222-7.
33. Aleksenko, A. Y., Makarova, N. A., Nikolaev, I. V., and Clutterbuck, A. J. (1995) Integrative and replicative transformation of *Penicillium canescens* with a heterologous nitrate-reductase gene, *Curr. Genet.*, **28**, 474-478, doi: 10.1007/BF00310818.
34. Чулкин А. М., Кислицин В. Ю., Зоров И. Н., Синицын А. П., Рожкова А. М. (2019) Определение копийности целевых генов карбогидраз в рекомбинантных штаммах гриба *Penicillium verruculosum*, *Биотехнология*, **35**, 51-57, doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-51-57.

DEVELOPMENT OF THE CHITINASE PRODUCER AND USE OF ENZYME PREPARATION FOR DISRUPTION OF MYCELIAL FUNGAL CELL WALL

O. A. Sinitsyna[1]*, E. A. Rubtsova[2], I. G. Sinelnikov[2], D. O. Osipov[2], A. M. Rozhkova[2], V. Yu. Matys[3], T. V. Bubnova[3], V. A. Nemashkalov[3], A. S. Sereda[4], L. A. Tcsherbakova[5], and A. P. Sinitsyn[1,2]

[1] *Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, 119991 Moscow, Russia; E-mail: oasinitsyna@gmail.com*

[2] *Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia*

[3] *Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia*

[4] *Russian Scientific Research Institute of Food Biotechnology, 111033 Moscow, Russia*

[5] *All-Russian Research Institute of Phytopathology, 143050 Bolshye Vyazemy, Moscow Region, Russia*

Received April 16, 2020
Revised April 18, 2020
Accepted April 18, 2020

A recombinant strain producing a complex of extracellular enzymes including chitinase from *Myceliophtora thermophila* was created based on the fungus *Penicillium verruculosum*. The activity of the enzyme preparations obtained from the cultural fluid of the producer strain was 0.55, 0.53, and 0.66 U/mg protein with chitin and chitosans with the molecular weight of 200 and 1000 kDa, respectively. The temperature optimum for the recombinant chitinase was 52-65°C; the pH optimum was 4.5-6.2, which corresponded to the published data for this class of the enzymes. The content of heterologous chitinase in the obtained enzyme preparations was 47% of total protein content in the cultural fluid. Enzyme preparations produced by the recombinant *P. verruculosum* XT403 strain and containing heterologous chitinase were able to degrade the mycelium of micromycetes, including phytopathogenic ones, and were very efficient in the bioconversion of microbiological industry waste.

Keywords: chitinase, chitin, chitosan, *Penicillium verruculosum*, phytopathogenic fungi, waste bioconversion