

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ КУТИНАЗЫ ИЗ ГРИБА *FUSARIUM SOLANI* И ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ЕЁ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ДЕЙСТВИЯ ГЛИФОСАТА

© 2024 г. Д. О. Осипов^{1, *}, Е. А. Рубцова², И. А. Шашков¹, А. Д. Сатрутдинов¹, А. М. Рожкова¹, Л. А. Щербакова³, М. В. Плаксина³, А. П. Синицын^{1, 2}

¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии”, Московская область, Одинцовский район, Большие Вяземы, 143050 Россия

*e-mail: doosipov@gmail.com

Поступила в редакцию 07.12.2023 г.

После доработки 31.01.2024 г.

Принята к публикации 16.02.2024 г.

Методом клонирования в штамме-реципиенте гена *cutB* получен штамм *P. verruculosum* продуцент внеклеточной кутиназы (КУТ) *Fusarium solani* с высоким уровнем экспрессии (более 40%). Из ферментного препарата (ФП), полученного высушиванием КЖ, хроматографическими методами был выделен гомогенный белок КУТ с высокой ферментативной активностью по отношению к пНФБ (1070 ед/мг). Гомогенная кутиназа обладала температурным оптимумом 55°C и pH-оптимумом при 8.0. КУТ сохраняла более 80% активности в течение 30 мин при температуре 50°C, около 50% при 60°C в течение 3 мин, при 70°C фермент полностью терял активность за 1 мин. ФП КУТ не обладал заметным фитотоксическим эффектом, но его совместное применение с глифосатом облегчало проникновение последнего в ткани растений, что выражалось в большей доле обработанных листьев с признаками поражения гербицидом. Синергический эффект, наблюдавшийся при совместном использовании ФП КУТ и гербицида позволил уменьшить дозировку последнего в 5 раз при том, что эффективность его действия снизилась всего в 2 раза. Подбор более эффективных комбинаций ФП КУТ с глифосатом для снижения его доз без потери истребляющего эффекта позволит уменьшить медицинские и экологические риски применения этого гербицида.

Ключевые слова: кутиназа, глифосат, *Fusarium solani*, *Penicillium verruculosum*

DOI: 10.56304/S0234275824010095

Кутиназы относятся к классу гидролаз и способны гидролизовать широкий спектр субстратов, содержащих сложноэфирные связи: различные полимеры природного и искусственного происхождения, триацилглицериды и собственно кутин. Некоторые из этих эстераз обладают способностью разрушать такой устойчивый к деградации полимер, как полиэтилентерефталат [1]. В природе кутиназы часто встречаются среди внеклеточных белков фитопатогенных грибов [2], что объясняется необходимостью проникать через покрывающую эпидерму растений кутикулу, состоящую на 40–80% из кутина [3]. Кутикула выполняет барьерную функцию и защищает растение от пыле-

вых частиц, воды, различных химических веществ, а также от попадания внутрь различных патогенов. Наличие такого рода защиты благоприятно для культурных растений, но затрудняет борьбу с сорными растениями, которая предполагает использование высоких концентраций гербицидов, таких как ингибиторы фотосистемы II, протопорфириногенаксидазы, пигментов, системы шикиматного пути. К последним относится один из самых востребованных гербицидов – глифосат.

Гербициды общего истребительного действия на основе глифосата широко используются для борьбы с сорными растениями в промышленном сельском хозяйстве и разрешены для применения на приусадебных участках. Однако глифосат относят к потенциально опасным для человека соединениям поэтому снижение его доз без потери искореняющего эффекта является актуальной зада-

Список сокращений: пНФБ – пара-нитрофенил бутират, ПЭГ – полиэтиленгликоль, КУТ – кутиназа, РД – рекомендуемая доза, КЖ – культуральная жидкость, Na-ДДС – натрия додецилсульфат, ФП – ферментный препарат.

чей, решение которой позволило бы уменьшить медицинские и экологические риски при его применении. Это может быть достигнуто разными способами. Например, гербицид смешивают с различными адьювантами-активаторами, увеличивающими его эффективность: сурфактантами, маслами и удобрениями [4]. Одним из современных подходов, который используют для усиления защитного эффекта других химических пестицидов, например, фунгицидов, является их комбинирование с природными экологически безопасными соединениями [5, 6], к которым, в том числе, относится кутиназа.

Целью данной работы было клонирование кутиназы *F. solani* в экспрессионной системе штамма-реципиента *P. verruculosum* 537 ($\Delta niaD$), выделение ее в гомогенном виде, изучение свойств и оценка способности полученного фермента усиливать фитотоксичность и гербицидный эффект одной из разрешенных к использованию препаративных форм глифосата в отношении сныти обыкновенной (*Aegopodium podagraria*) – одного из многолетних сорняков, для вегетационной обработки которых рекомендован глифосат.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы

В работе штаммом-реципиентом служил ауксотрофный штамм *P. verruculosum* 537 ($\Delta niaD$); бактериальный штамм *Escherichia coli* Mach1TM T1 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) использован для субклонирования гена кутиназы *cutB*; штамм *Fusarium solani* 100138 (11/2) – для получения геномной ДНК.

Реагенты

Реактивы для буферных растворов были приобретены у фирм Bio-Rad (США), “Хеликон” и “Реахим” (Россия); п-нитрофенилбутират (пНФБ) – у фирмы Sigma (США).

Аmplификация и клонирование

Для амплификации гена кутиназы в качестве матрицы использована геномная ДНК штамма *F. solani* 100138 (11/2), выделенная с помощью набора DNeasyPlant Mini Kit (Qiagen, США). Олигонуклеотидные праймеры сконструированы на основе опубликованной последовательности гена кутиназы (GenBank: K02640.1) *F. solani*; для обеспечения безрестрикционного лигирования на 5'-концы олигонуклеотидов введены дополнительные последовательности (30–33 п.н.):

CUT-B1-FOR1

5'-CTCTCACCACACTTCTCGCCGCCACG-GCTTCGGTCTGCCT-3'

CUT-B1-LIC5

5'-CAAACAGAAGCAACCGACACAAT-GAAATTCTTCGCTCTCACCACACTTCTCGC-3'

CUT-B1-LIC3

5'-GAGGAGAAGCCCGGTCAAGCAGAAC-CACGGACAGCCCGAACCTTCTCG-3'

ПЦР проводили в две стадии с использованием Phire Hot Start II. Первая стадия с праймерами CUT-B1-FOR1 и CUT-B1-LIC3 в следующих условиях: 98°C – 30 с, 98°C – 5 с, 50°C – 5 с, 72°C – 15 с, 15 циклов, 72°C – 1 мин. Вторая стадия с праймерами CUT-B1-LIC5 и CUT-B1-LIC3 в идентичных условиях. Амплификат выделяли из агарозного геля с помощью набора QiAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

Плазмидная конструкция, содержащая ген кутиназы, получена методом независимого лигирования [7]. Для этого полученный фрагмент и линеаризованный вектор pUC-SВН1, содержащий промоторную и терминаторную области гена *cbh1* гриба *P. verruculosum*, обрабатывали T4-ДНК полимеразой (Thermo Fisher Scientific) при 22°C в течение 30 мин и затем 30 мин при 80°C (в присутствии dATP для вставки и dTTP для вектора). Последующее лигирование вектора и вставки проводили в течение 20 мин при 22°C. Клетки *E. coli* Mach1 (F– $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 hsdR(rK-, mK+) \Delta recA1398 endA1 tonA$) трансформировали полученной конструкцией pСВН1-CutB по стандартной методике [16]. Бактериальные колонии отбирали на селективной среде LB с ампициллином (100 мкг/мл). Наличие вставки целевого гена подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру.

Трансформация штамма-реципиента *P. verruculosum* 537 ($\Delta niaD$)

Трансформацию протопластов штамма-реципиента проводили, используя конструкцию pСВН1-CutB вместе с котрансформирующей плазмидой pSTA10 (в массовом соотношении 10 : 1 соответственно), по модифицированному Са-Cl₂-ПЭГ методу [8]. Первичную селекцию рекомбинантных клонов осуществляли на агаризованной среде с 10 мМ NaNO₃.

Культивирование рекомбинантных штаммов и получение ферментных препаратов (ФП)

Рекомбинантные штаммы культивировали в 750-миллилитровых качалочных колбах в 100 мл питательной среды для *P. verruculosum* (г/л): микрористаллическая целлюлоза (МКЦ) – 40, пшеничные отруби – 10, дрожжевой экстракт – 10, КН₂Р₄ – 15, (NH₄)₂SO₄ – 5, СаCl₂·2Н₂О – 0.3, MgSO₄·7Н₂О – 0.3 – при 30°C и перемешивании со скоростью 220 об./мин в течение 6 сут. Отобранный трансформант культивировали далее в 1-лит-

ровом ферментере КФ-104/3 (ООО “Проинтех”, Россия), используя питательную среду следующего состава (г/л): глюкоза – 40, МКЦ – 40, пшеничные отруби – 10, кукурузный экстракт – 30, мочевины – 2.5, KH_2PO_4 – 14, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 10, CaCl_2 – 0.6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.6 (pH 5.0) – при 30°C в течение 144 ч. В ходе ферментации трижды проводили подпитку глюкозной патокой и МКЦ. Для получения сухого ФП из культуральной жидкости (КЖ) удаляли клеточную массу с помощью центрифугирования на центрифуге Avanti JXN-26 (Beckman Coulter, США) при 6842 g в течение 30 мин, полученный супернатант высушивали на распылительной сушке Mini Spray Dryer B-290 (Buchi AG, Швейцария).

Определение кутиназной активности

Кутиназную активность определяли с помощью пНФБ в качестве субстрата по начальной скорости образования п-нитрофенола [9]. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для образования 1 мкм п-нитрофенола за 1 мин при pH 5.0 и 50°C.

Определение концентрации белка

Концентрацию белка определяли по методу Лоури, используя БСА в качестве стандарта [10]. Концентрацию белка во фракциях определяли по оптической плотности при 280 нм на спектрофотометре NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific).

Электрофорез белков

Электрофорез проводили в 12%-ном ПААГ с Na-ДДС на приборе MiniProtein (Bio-Rad) по инструкции производителя.

Выделение кутиназы

Выделение и очистку кутиназы осуществляли с помощью хроматографической системы ÄKTA pure (GE Healthcare Life Sciences, США) с УФ-детектором. Белок из КЖ (или раствора ФП) осаждали сульфатом аммония (80% от насыщения) и растворяли в 1 мл 0.05 М Na-ацетатного буфера (pH 5.0). Выделение проводили в несколько этапов: сначала с помощью гель-проникающей хроматографии на носителе Bio-Gel P2, потом образец был подвергнут разделению на колонке MonoQ (10 мл) в линейном градиенте (0–40%) 1 М NaCl в 20 mM bis-Tris/HCl, pH 6.8 буфере. Затем на гидрофобной колонке Source 15Iso 1мл, в 50 mM Na-ацетатном буфере pH 5.0, элюция градиентом 1.7 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ от 100 до 0% за 20 объемов колонки. Наличие целевого белка во фракциях контролировали по активности, используя пНФБ в качестве субстрата.

Идентификация кутиназы методом масс-спектрометрии

Для масс-спектрометрического анализа использовали метод пептидного картирования после расщепления белка, содержащегося в соответствующей полосе геля, трипсином (Promega, США) [11]. MALDI-масс-спектрометрию трипсинового гидролизата проводили на времяпролетном масс-спектрометре UltrafleXtreme (Bruker Daltonik GmbH, Германия) в ЦКП “Промышленные биотехнологии” ФИЦ Биотехнологии РАН. Полученные данные интерпретировали путем сравнения масс полученных пептидов и теоретически рассчитанных с помощью сервиса Peptide-Mass (http://web.expasy.org/peptide_mass/).

Влияние температуры и pH на ферментативную активность кутиназы

Влияние температуры и значения pH реакционной смеси анализировали в 0.05 М универсальном (CH_3COOH , H_3BO_3 , H_3PO_4) буфере в диапазоне pH 3–10 и температур 25–70°C. Кутиназную активность представляли в процентах от максимального значения в оптимальных условиях.

Анализ термостабильности кутиназы

Термостабильность кутиназы исследовали при 50, 60 и 70°C в 0.1 М натрий-ацетатном буфере pH 5.0. Растворы фермента инкубировали при заданной температуре в течение 1–180 мин. В отобранных через заданные промежутки времени пробах определяли кутиназную активность, которую выражали в процентах от исходной.

Условия лабораторных испытания ФП на изолированных листьях сныти

Листья одинакового размера, собранные с дикорастущих растений сныти обыкновенной (*Aegopodium podagraria*), помещали на решетку, установленную во влажной камере (7–10 листьев на вариант, каждый в трехкратной повторности) и наносили на адаксиальную сторону листьев капли (объем капли 15 мкл, 12–15 капель/лист):

- либо растворенного в дистиллированной воде высушенного на распылительной сушке ФП кутиназы (КУТ) в концентрации 20 мг/мл (1),
- либо глифосат (в виде препарата Рузмин[®], ВР 360) в концентрации 3.6 мг/мл, рассчитанной в соответствии с нормой применения, рекомендуемой производителем для обработок по вегетации [12],
- либо глифосат в концентрации, составляющей 1/5 от этой концентрации,
- либо смесь глифосата (1/5) и ФП КУТ (20 мг/мл).

Через 5 сут после нанесения тестируемых растворов в каждом варианте подсчитывали число листьев с симптомами фитотоксического повреждения и рассчитывали их процент от общего количества обработанных листьев. Контролем служили листья, обработанные тем же количеством капель (объемом 15 мкл) дистиллированной воды.

Условия проведения полевого эксперимента

В зарослях дикорастущей сныти на территории опытного участка ВНИИФ (Московская обл.) были выделены мини-делянки, площадью 0.075 кв.м, растения на которых были дважды (с десятидневным интервалом) обработаны гербицидом, ФП КУТ или их смесью с помощью микродисперсного опрыскивания.

В опыт были включены следующие варианты обработки.

1. Гербицид – Рузмин® ВР, (действующее вещество глифосат, 360 г/л) в рекомендуемой производителем норме применения препарата 6.0 л/га и расхода рабочего раствора 100 л/га (РД) [12].

2. ФП КУТ в концентрации 40 мг/мл дистиллированной воды, расход рабочего раствора такой же, как в варианте 1.

3. Гербицид, доза которого составила 20% от РД.

4. ФП КУТ, 40 мг/мл + гербицид, 20% от РД.

Перед обработкой подсчитывали число растений на каждой миниделянке. В ходе полевого эксперимента фиксировали состояние обработанных растений через 10 сут после второй обработки и через 17 сут после нее. В конце эксперимента в каждом варианте определяли число погибших растений. Кроме того, измеряли среднюю высоту растений, обработанных ферментным препаратом, и сравнивали этот показатель со средней высотой контрольных, не подвергавшихся обработкам, растений. Для подтверждения синергического эффекта при совместном применении ФП КУТ и гербицида (вариант 4) применяли критерий Липмела ($E_0 < E_r$ при $p \leq 0.05$) [21]. В конце эксперимента со всех обработанных делянок полностью удаляли надземные части уцелевших растений и через месяц после этого оценивали последствие обработок по числу вновь появившихся растений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отбор штаммов-продуцентов кутиназы

Полученные рекомбинантные штаммы-продуценты кутиназы, выросшие на чашках с нитратом натрия, культивировали на жидкой питательной среде в колбах. При проведении электрофоретического анализа полученных КЖ были выявлены клоны, в которых присутствовала белковая полоса в области 20–25 кДа, но которой не было в

штамме-реципиенте. В КЖ этих клонов была обнаружена кутиназная активность – до 180–190 ед/мл в случае клонов № 8–11, в то время как у штамма-реципиента кутиназная активность не была выявлена. Масс-спектрометрический анализ трипсиновых гидролизатов этой белковой полосы показал наличие пептидов с m/z , идентичным теоретически рассчитанным в программе PeptideMass (ExPASy), при этом покрытие аминокислотных последовательностей составило 57%. Полученные данные свидетельствуют о наличии экспрессии гена кутиназы в реципиентном штамме *P. verruculosum* 537 ($\Delta niaD$).

Кутиназная активность ферментного препарата

Из КЖ после ферментации клона № 8 в лабораторных ферментерах с помощью распылительной сушилки получен сухой ФП кутиназы (КУТ). На электрофореграмме ФП КУТ видна полоса в области 18–25 кДа (рис. 1). Содержание белка в 1 л КЖ составило 14.5 г; содержание белка в сухом ФП и удельная активность в нем КУТ в отношении пНФБ равны 164 мг/г и 1100 ед/г соответственно.

Анализ электрофореграммы (рис. 1) с помощью программы GelAnalyzer 2010 показал, что доля кутиназы в сухом ФП составило 40.5% от общего количества белка. Отметим, что контрольный ФП, полученный с помощью штамма-реципиента, содержал полный целлюлолитический комплекс, состоящий из целлобиогидролаз I и II (ЦБГ I и ЦБГ II, их общий вклад – 60%) и эндоглюканаз (12%), а также включал другие ферменты (28%) [13]. От исходного целлюлолитического комплекса штамма-реципиента в составе рекомбинантного ФП присутствовала ЦБГ I и ЦБГ II (47% от общего секретируемого белка).

Свойства гомогенной рекомбинантной кутиназы

Гомогенная рекомбинантная кутиназа была выделена из ФП, полученного с помощью рекомбинантного штамма-продуцента, последовательно в две стадии, с помощью анионообменной и гидрофобной хроматографии с предварительным обессоливанием на носителе Bio-Gel P2. Активность гомогенной кутиназы по отношению к пНФБ составила 1070 ед/мг. Схожими значениями активности по аналогичному субстрату обладали ферменты из грибов *Thelavia terrestris* (983 ед/мг) [9] и из *Malbranchea cinnamomea* (1147.9 ед/мг) [14].

Кинетические константы при гидролизе пНФБ, определенные по методу Лайнуивера-Берка, составили: V_{\max} 1.96 мкМ мин⁻¹ мг⁻¹, k_{cat} 1.32 с⁻¹, K_m 0.83 мМ и k_{cat}/K_m 1.6 мМ⁻¹ с⁻¹. Эти данные коррелируют с кинетическими параметрами других грибных кутиназ ($K_m = 0.66$ мМ, $k_{\text{cat}} = 0.46$ с⁻¹) [14], ($K_m = 0.21$ мМ, 0.73 с⁻¹) [15], хотя “эффектив-

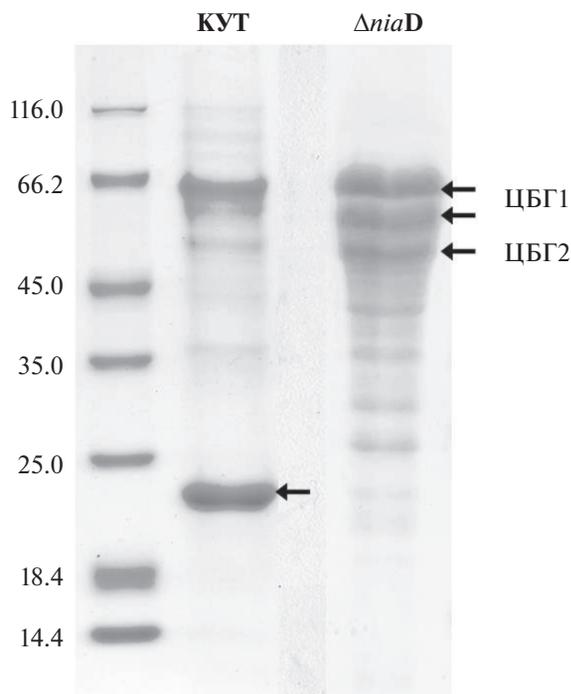


Рис. 1. Электрофореграмма сухого ФП КУТ, стрелкой отмечена полоса, которая соответствует кутиназе, а также ФП штамма-реципиента *P. verruculosum* 537 ($\Delta niaD$), стрелками указаны целлюбиогидролазы I и II (ЦБГ1 и ЦБГ2).

Fig. 1. Electrophoregram of the dry EP CUT, the arrow indicates the band that corresponds to cutinase, and the EP of the recipient strain *P. verruculosum* 537 ($\Delta niaD$), the arrows indicate cellobiohydrolases I and II (CBHI and CBHII).

ность” k_{cat}/K_M кутиназы *Aspergillus oryzae* более высокая — $59.2 \text{ mM}^{-1} \text{ c}^{-1}$.

Гомогенная кутиназа проявляла максимальную активность при 55°C (рис. 2a), при этом в интервале от 28 до 62°C ферментативная активность составляла более чем 50% от максимальной. Такой же температурный оптимум для активности наблюдался у фермента из *T. terrestris* [9], несколько ниже была оптимальная температура для кутиназы из *Malbranchea cinnamomea* — 45°C [14], еще ниже из *F. oxysporum* — 40°C [16], из термофильных кутиназ известен фермент из *A. nidulans* [17] с температурным оптимумом 60°C .

Оптимальное значение pH для полученного рекомбинантного фермента составило 8 (рис. 2b), фермент сохранял более 50% активности при pH от 5 до 9.5. Среди ферментов, обладающих кутиназной активностью, присутствуют белки с различными значениями pH-оптимумов. Так, кутиназа *A. niger* обладала оптимумом, лежащим в области 5.0 – 6.5 [18], фермент *T. terrestris* — при pH 4.0 [9], с другой стороны, кутиназы близкородственного гриба *F. oxysporum* [16] и термофильного гриба *M. cinnamomea* [14] имели pH-оптимум

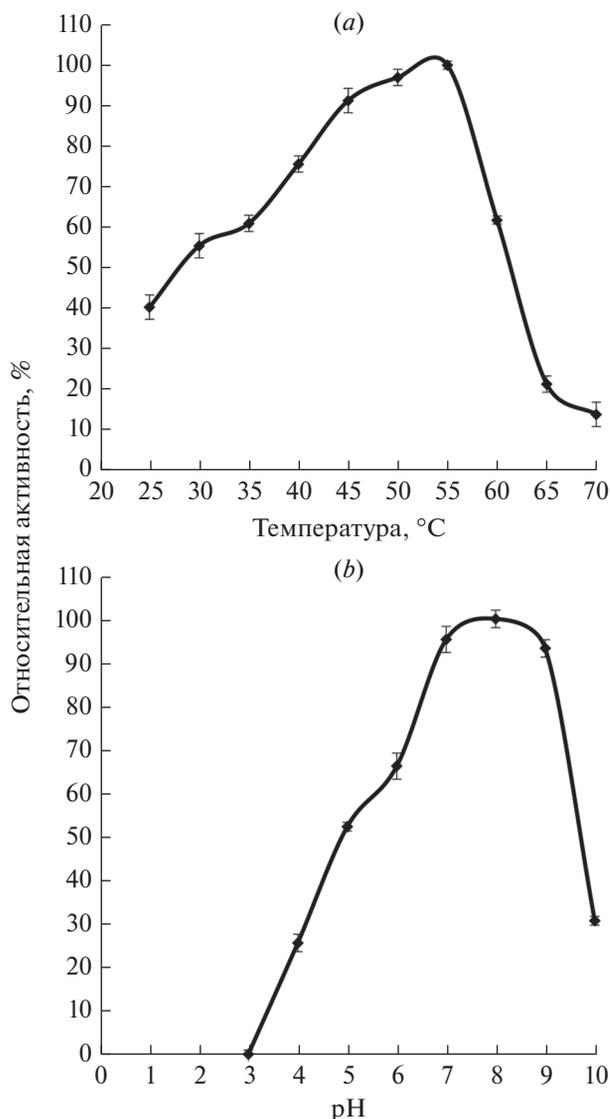


Рис. 2. Зависимость активности гомогенной кутиназы от температуры (a) и pH (b). Температурный оптимум работы фермента определяли, измеряя активность в течение 10 минут при различных температурах (25 – 70°C) и pH 5.0, pH-оптимум — при различных значениях pH (3 – 10) и температуре 50°C .

Fig. 2. Dependence of homogeneous cutinase activity on temperature (a) and pH (b). The temperature optimum of the enzyme activity was determined by measuring the activity for 10 min at different temperatures (25 – 70°C) and pH 5.0, pH optimum — at different pH values (3 – 10) and temperature 50°C .

при 8.0 , а из аскомицета *A. nidulans* [17] и бактерии *Thermobifida cellulosilytica* [19] обладали оптимумом в еще более щелочной области — при pH 9.0 . Таким образом, рекомбинантный фермент *F. solani* обладала свойствами общими с другими кутиназами грибного происхождения.

Термостабильность кутиназы анализировали в водном растворе при температурах 50 , 60 и 70°C и

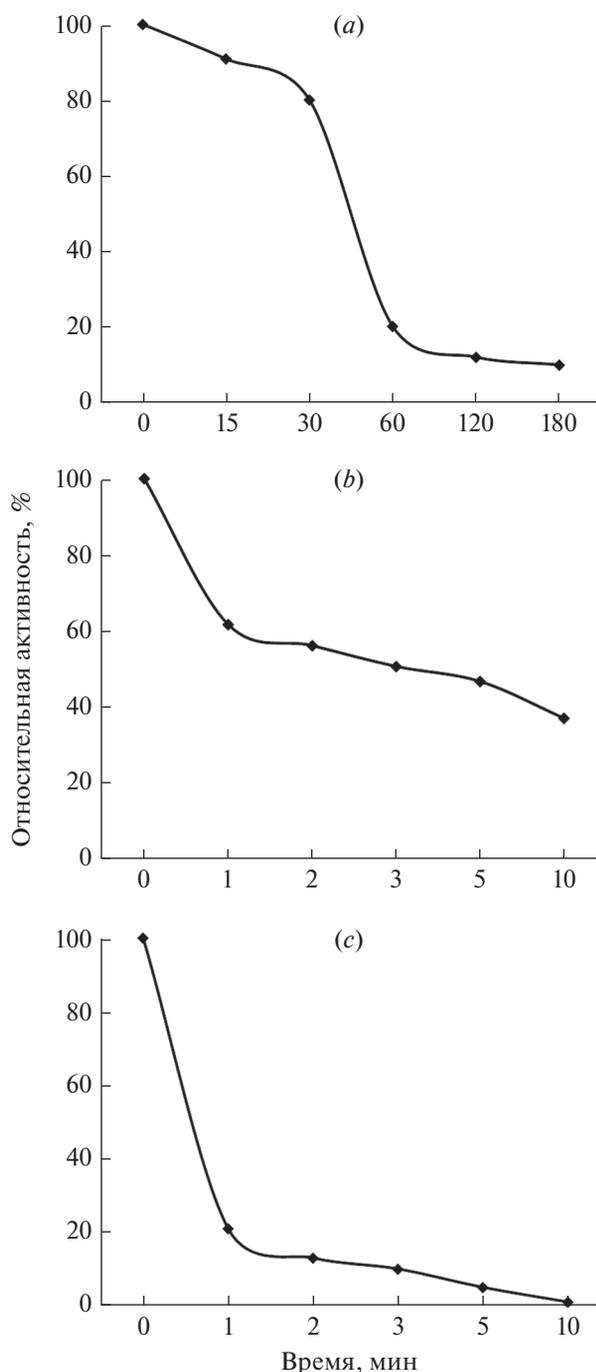


Рис. 3. Стабильность гомогенной кутиназы в водном растворе при различных температурах: 50 (а), 60 (б) и 70°C (с) при pH 5.0.

Fig. 3. Stability of homogeneous cutinase in aqueous solution at different temperatures: 50 (a), 60 (b) and 70°C (c) at pH 5.0.

pH 5.0 (рис. 3). Относительная активность полученного фермента при 50°C оставалась выше 80% в течение 30 мин, при 60°C около 50% активности сохранялось в течение 3 мин, при 70°C практическая полная потеря активности происходила уже через 1 мин.

Оценка фитотоксичности ферментного препарата в лабораторных условиях с использованием изолированных листьев сныти

Результаты тестирования ФП КУТ показали, что уровень ее фитотоксичности был заметно ниже, чем у глифосата и примерно соответствовал фитотоксичности, которая была отмечена для сниженной в 5 раз концентрации этого гербицида. Так, через 5 сут после нанесения тестируемых препаратов число изолированных листьев с симптомами фитотоксического повреждения в виде желто-бурых пятен и краевого увядания после обработки ФП КУТ в концентрации 20 мг/мл оказалось вдвое ниже, чем после нанесения гербицида в рекомендованной дозе. В то же время, нанесение гербицида в этой концентрации совместно с ФП КУТ приводило к усилению фитотоксического эффекта, достоверно превышавшего его действие в рекомендованной дозе (рис 4а). На обработанных водой, контрольных, листьях признаки пожелтения и увядания отсутствовали. Эти данные свидетельствуют о том, что рекомбинантная кутиназа из *F. solani*, вероятно, способствуют проникновению гербицида в растение, что согласуется с данными, полученными ранее для препарата одной из бактериальных кутиназ [20]. В то же время было бы целесообразно продолжить опыты по определению фитотоксичности полученного ферментного препарата, чтобы оценить вклад в этот эффект целлюлаз реципиентного штамма 537, входящих, как отмечалось выше, в состав ФП КУТ.

Оценка способности ферментного препарата усиливать гербицидный эффект глифосата в полевых условиях

Результаты лабораторного тестирования были подтверждены данными, полученными в полевых условиях. Незначительные симптомы повреждения листьев, отмеченные после первой обработки, с течением времени не усиливались, и, по мере появления новых листьев, растения постепенно восстанавливали свой исходный вид. В конце эксперимента состояние растений, дважды обработанных ФП КУТ, и их высота не отличалась от контрольных, необработанных, растений (рис. 4б), а на соответствующей мини-делянке доля погибших растений составляла всего 5.2% от контроля (рис. 5б).

Как и ожидалось, глифосат в рекомендованной дозе вызвал практически полную гибель обработанных растений, при этом снижение его дозы до 20% от рекомендованной приводило к существенному ослаблению гербицидного эффекта (рис. 4с). ФП КУТ значительно усиливал действие 20%-ной дозы гербицида (рис. 4с, рис. 5), причем взаимодействие кутиназы с глифосатом носило синергический характер. Так, число по-

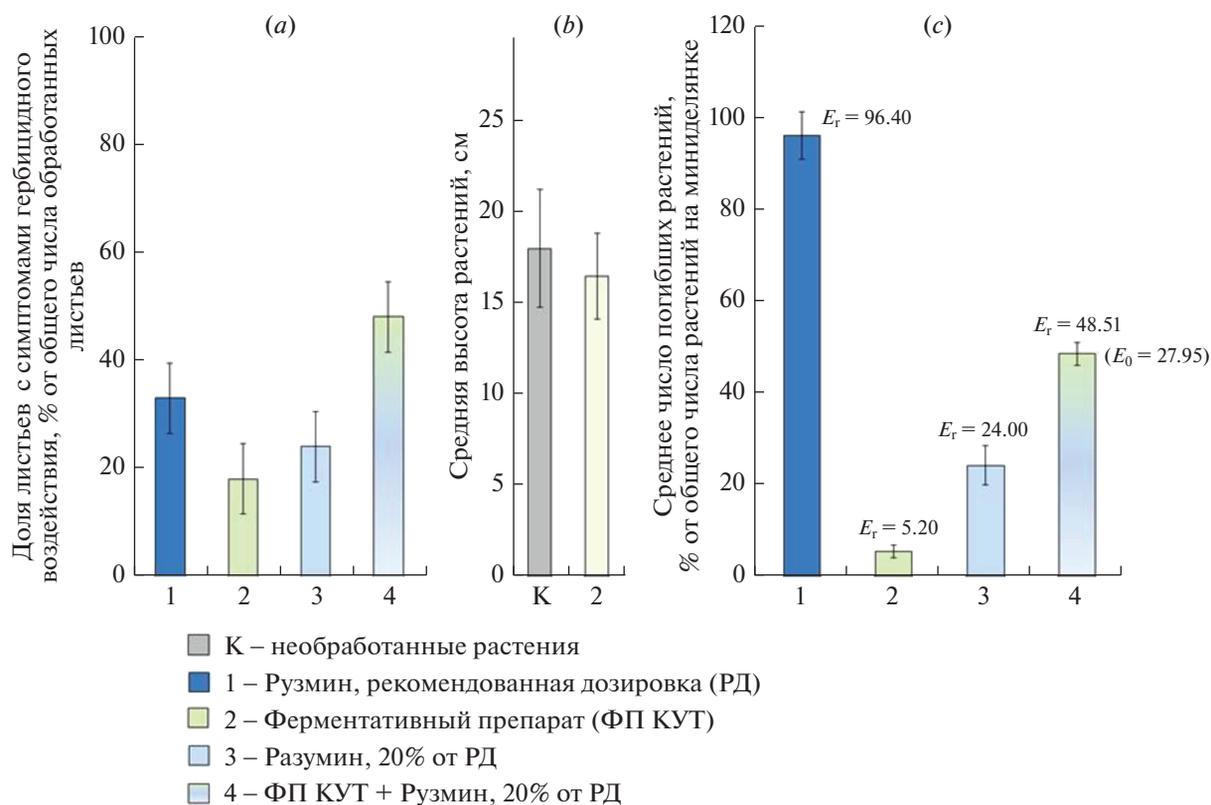


Рис. 4. Гистограммы, иллюстрирующие относительно низкую фитотоксичность ФП (a, b) и усиление гербицидного эффекта глифосата при его использовании вместе с ФП КУТ (a, c) в лабораторном (a) и полевом ((b, c) экспериментах. Цифры над колонками показывают процент погибших растений в каждом из вариантов обработки (E_r) и уровень ожидаемого аддитивного эффекта (E_0), рассчитанный согласно формуле Лимпела: $E_0, \% = (X + Y) - XY/100$. Различия между E_0 и E_r достоверны при $p \leq 0.05$.

Fig. 4. Histograms illustrating the relatively low phytotoxicity of EP CUT (a, b) and the enhanced herbicidal effect of glyphosate when used together with EP CUT (a, c) in laboratory (a) and field (b, c) experiments. The numbers above the columns show the percentage of dead plants in each treatment (E_r) and the level of expected additive effect (E_0), calculated according to Limpel's equation: $E_0, \% = (X + Y) - XY/100$. Differences between E_0 and E_r are reliable at $p \leq 0.05$.

гибших растений после совместного применения ферментного и гербицидного препаратов составило 48.51%, что почти вдвое превышало рассчитанный по формуле Лимпела [21] аддитивный эффект (27.95%), ожидаемый от суммарного воздействия 20% дозы глифосата и ФП КУТ (рис. 4c).

Более того, через месяц после удаления наземных частей всех обработанных растений полное отсутствие вторичного роста было отмечено только в том случае, когда гербицид применяли совместно с ФП КУТ. После применения РД Рузмина® было обнаружено единственное вновь появившееся растение. Количество вторичных всходов после опрыскивания растений 20%-ным Рузмином® составило 14–19% от произраставших до обработки, а больше всего растений (от 32 до 36%), развитие которых не отличалось от контрольных, через месяц появилось там, где применяли ФП КУТ.

Вероятно, использование ФП КУТ с 20%-ным Рузмином®, не только усиливало, но и пролонгировало действие последнего.

Таким образом, ФП КУТ – ФП с высоким содержанием кутиназы (до 40% от общего внеклеточного белка) получен из созданного штамма-продуцента кутиназы *P. verruculosum* КУТ. Изучены физико-химические свойства и фитотоксичность гомогенного фермента, выделенного из ФП хроматографическими методами. ФП КУТ не обладал заметным фитотоксическим эффектом, однако при совместном применении с глифосатом способствовал его проникновению в ткани растений, что выражалось в большей доле обработанных листьев с признаками гербицидного поражения в лабораторных экспериментах и в значительном усилении гербицидного эффекта низкой дозы глифосата в полевых условиях.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности продолжения и расширения исследований, направленных на подбор более эффективных комбинаций глифосата с исследуемым ФП КУТ с целью достижения истребительной активности, свойственной 100% гербициду, и позволяют пред-

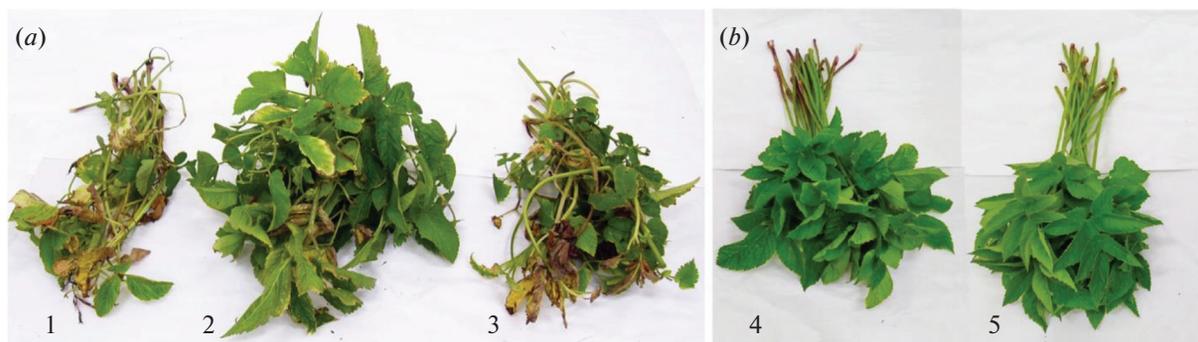


Рис. 5. Собранные в конце эксперимента побеги сныти, сохранившиеся на мини-делянках после обработок (а) гербицидом в рекомендуемой производителем 100%-ной дозе (1), 20%-ной дозой гербицида (2) и его 20%-ной дозой вместе с ФП КУТ (3); (б) — необработанные (4) и обработанные только ФП КУТ (5) растения.

Fig. 5. Collected at the end of the experiment *Aegopodium podagraria* shoots preserved on mini-plots after treatments (a) with herbicide at an application dose recommended by manufacturer (1), 20% herbicide dose (2) and 20% herbicide dose with EP CUT (3); (b)—untreated (4) and treated only with EP CUT (5) plants.

полагать, что в случае их применения снижение дозы глифосата не будет повышать риск отбора резистентных форм сорных растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Herrero Acero, E., Ribitsch D., Steinkellner G., Gruber K., Greimel K., Eiteljoerg I., Trotscha E., Wei R., Zimmermann W., Zinn M., Cavaco-Paulo A., Freddi G., Schwab H., Guebitz G. Enzymatic surface hydrolysis of PET: Effect of structural diversity on kinetic properties of cutinases from *Thermobifida*. *Macromolecules*, 2011, 44(12), 4632–4640. <https://doi.org/10.1021/ma200949p>
- Fan C.Y., Köller W. Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: Differential and sequential expression of cutinolytic esterases by *Alternaria brassicicola*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1998, 158(1), 33–38. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12796.x>
- Heredia A. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.*, 2003, 1620(1–3), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00510-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00510-X)
- Curran W.S., Liebl R.A., Lingenfelter D.D. Adjuvants for enhancing herbicide. 1999, 814, 1–12.
- Dzhavakhiya V., Shcherbakova L., Semina Y., Zhemchuzhina N., Campbell B. Chemosensitization of plant pathogenic fungi to agricultural fungicides. *Front. Microbiol.*, 2012, 3, 87. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00087>
- Shcherbakova L.A., Dzhavakhiya V.G., Popletaeva S.B., Arslanova L.R., Smetanina T.I. Augmenting the protective effect of two difenoconazole-containing fungicides against stem canker of potato using plant resistance inducing bacterial protein MF3. *AIP Conf. Proc.*, 2022, 2390(1), 30086. <https://doi.org/10.1063/5.0069813>
- Aslanidis C., de Jong P.J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18(20), 6069–6074. <https://doi.org/10.1093/nar/18.20.6069>
- Penttilä M., Nevalainen H., Rättö M., Salminen E., Knowles J. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 1987, 61(2), 155–164. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90110-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90110-7)
- Xu H., Yan Q., Duan X., Yang S., Jiang Z. Characterization of an acidic cold-adapted cutinase from *Thielavia terrestris* and its application in flavor ester synthesis. *Food Chem.*, 2015, 188, 439–445. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.026>
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193(1), 265–275.
- James P. Proteome Research: Mass Spectrometry. ed. James P. Heidelberg: Springer Verlag, 2001, 274.
- <https://www.agroxxi.ru/goshandbook/prep/ruzmin-vr>
- Синицын, А.П., Синицына, О.А., Рожкова А.М. Получение промышленно важных ферментов на основе экспрессионной системы грибов *Penicillium verrucosum*. *Биотехнология*, 2020, 36(6), 24–41.
- Duan X., Liu Y., You X., Jiang Z., Yang S., Yang S. High-level expression and characterization of a novel cutinase from *Malbranchea cinnamomea* suitable for butyl butyrate production. *Biotechnol. Biofuels.*, 2017, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0912-z>
- Zhiqiang L., Gosser Y., Baker P.J., Ravee Y., Ziying L., Alemu G., Huiguang L., Butterfoss G.L., Kong X.P., Gross R., Montclare J. K. Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase: Enhanced thermostability and hydrolytic activity of synthetic ester and polyester degradation. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131(43), 15711–15716. <https://doi.org/10.1021/ja9046697>
- Kanelli M., Vasilakos S., Nikolaivits E., Ladas S., Christakopoulos P., Topakas E. Surface modification of poly(ethylene terephthalate) (PET) fibers by a cutinase from *Fusarium oxysporum*. *Process Biochem.*, 2015, 50(11), 1885–1892. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.08.013>
- Bermúdez-García E., Peña-Montes C., Castro-Rodríguez J. A., González-Canto A., Navarro-Ocaña A., Far-

- rés A.* ANCUT2, a thermo-alkaline cutinase from *Aspergillus nidulans* and its potential applications. *Appl Biochem Biotechnol.*, 2010, 182, 1014–1036. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2378-z>
18. Nyyssölä A., Pihlajaniemi V., Järvinen R., Mikander S., Kontkanen H., Kruus K., Kallio H., Buchert J. Screening of microbes for novel acidic cutinases and cloning and expression of an acidic cutinase from *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Enzyme Microb. Technol.*, 2013, 52(4–5), 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.01.005>
19. Jiddah Usman N., Rodrid, K., Sabo A.Y, Tuncharoen N., Meegnoen K., Pason P., Jongruja N. Characterization of recombinant cutinase from *Thermobifida cellulolytica* and its application in tomato cutin degradation. *Bio-catal. Agric. Biotechnol.*, 2023, 47, 102603. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102603>
20. Poulouse Ayrookaram J. K.P. Enzymes as agricultural chemical adjuvants. European Patent Office Publ. of Application with search report EP19870310146. 1987.
21. Richer D.L. Synergism—a patent view. *Pestic. Sci.*, 1987, 19(4), 309–315. <https://doi.org/10.1002/ps.2780190408>

Production of a Recombinant Cutinase from *Fusarium solani* and Estimate of its Ability to Enhance Glyphosate Effect

D. O. Osipov^{a, #}, E. A. Rubtsova^b, I. A. Shashkov^a, A. D. Satrutdinov^a, A. M. Rozhkova^a, L. A. Shcherbakova^c, M. V. Plaksina^c, and A. P. Sinitsyn^{a, b}

^aFederal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^bLomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

^cAll-Russian Research Institute of Phytopathology, Moscow region, Odintsovo district, Bolshiye Vyazemy, 143050 Russia

[#]e-mail: doosipov@gmail.com

Abstract—A *P. verruculosum* strain producing *Fusarium solani* extracellular cutinase CUT with a high level of expression (more than 40%) was obtained by cloning the cutB gene in recipient strain. Homogeneous CUT protein with high pNPB enzymatic activity (1070 units/mg) was purified by chromatographic methods. The homogeneous cutinase had a temperature optimum at 55°C and a pH optimum at 8. CUT retained more than 80% activity for 30 min at 50°C, about 50% activity was retained for 3 min at 60°C, and the enzyme completely lost activity in 1 min at 70°C. CUT EP had no significant phytotoxic effect, but its enzymatic activity facilitated the penetration of herbicide into plant tissues, which was expressed in a greater proportion of treated leaves with signs of glyphosate injuries. Joint application of CUT EP and herbicide resulted in a synergistic effect and allowed reducing the herbicide dosage 5 times, while the effectiveness of the latter decreased only 2 times.

Keywords: cutinase, glyphosate, *Fusarium solani*, *Penicillium verruculosum*