

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ –
филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности
пищи (ВНИИПБТ – филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»)

На правах рукописи

ВЕЛИКОРЕЦКАЯ Ирина Александровна

**СОЗДАНИЕ НОВЫХ КОМПЛЕКСНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ
ГРИБНЫХ ПРОТЕАЗ НА ОСНОВЕ ШТАММА *PENICILLIUM CANESCENS*
ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ КОНВЕРСИИ БЕЛОКСОДЕРЖАЩЕГО
РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

Специальность 05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов и биологически
активных веществ

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель
д.х.н., проф. Сеницын А.П.

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ	13
1.1 Протеолитические ферменты	13
1.1.1 Экзопептидазы	15
1.1.2 Эндопептидазы	18
1.2 Применение протеолитических ферментов при гидролизе растительного белоксодержащего сырья.....	24
1.2.1 Основные виды белоксодержащего растительного сырья	24
1.2.1.1 Характеристика зернового сырья.....	24
1.2.1.2 Характеристика бобового сырья	29
1.2.2 Применение протеолитических ферментов при переработке растительного сырья	31
1.3 Грибные продуценты протеаз.....	35
1.4 Подходы к получению грибных рекомбинантных продуцентов.....	39
1.4.1 Использование мицелиальных грибов для продукции рекомбинантных белков.....	39
1.4.2 Создание экспрессионной системы на основе штамма <i>P. canescens</i>	42
1.4.2.1 Выбор селективного маркера для штамма <i>P. canescens</i>	42
1.4.2.2 Идентификация и выделение сильных промоторов для экспрессии генов...	45
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	47
2 ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ.....	48
2.1 Штаммы-микроорганизмы.....	48
2.2 Используемые плазмидные конструкции	49
2.3 Получение плазмидных конструкций	49
2.4 Получение протопластов и трансформация реципиентного штамма.....	51
2.4.1 Получение компетентных клеток реципиентного штамма <i>P. canescens</i> RN3- <i>11-7 niaD⁻</i>	51
2.4.2 Трансформация	52

2.4.3	Рассев протопластов на агаризованные среды	52
2.5	Среды для культивирования штаммов	53
2.6	Ферментные препараты.....	54
2.7	Субстраты	54
2.8	Определение активности ферментов.....	54
2.9	Определение концентрации белка.....	56
2.10	Электрофорез в полиакриламидном геле	56
2.11	Определение pH- и температурных оптимумов ферментных препаратов....	56
2.12	Определение термостабильности ферментных препаратов	57
2.13	Анализ компонентного состава ферментных препаратов	57
2.14	Методы анализа суслу и бражки	58
2.15	Структура экспериментальных исследований	58
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	60
3.1	Получение рекомбинантных штаммов.....	60
3.1.1	Создание продуцента пенициллопепсина – трансформация штамма <i>P. canescens</i> RN3-11-7 <i>niaD</i> ⁻ плазмидой pPrXEG_PEP	60
3.1.2	Создание продуцента пенициллопепсина и лейцинаминопептидазы – котрансформация штамма <i>P. canescens</i> RN3-11-7 <i>niaD</i> ⁻ плазмидами pPrXEG_PEP и pPrAbf_Lap	65
3.1.3	Создание продуцента комплекса протеаз – котрансформация штамма <i>P. canescens</i> RN3-11-7 <i>niaD</i> ⁻ плазмидами pPrXEG_alcPr_Aor, pPrXEG_PEP и pPrAbf_Lap1	67
3.1.3.1	Оптимизация методики электрофоретического анализа культуральной жидкости трансформантов <i>P. canescens</i> , имеющих активность сериновой протеазы	70
3.1.4	Создание продуцента сериновой протеазы – трансформация штамма <i>P. canescens</i> RN3-11-7 <i>niaD</i> ⁻ плазмидой pPrXEG_alcPr_Aor	72
3.1.4.1	Профили pH- и температурной зависимости активности сериновой протеазы штамма <i>P. canescens</i> Oryzin-25.....	74

3.1.4.2 Индукция биосинтеза сериновой протеазы штаммом <i>P. canescens</i> Oryzin-25 при глубинном культивировании	75
3.1.5 Исследование стабильности полученных рекомбинантных штаммов при последовательных пересевах.....	77
3.2 Получение сухих ферментных препаратов на основе новых рекомбинантных штаммов <i>P. canescens</i>	83
3.2.1 Получение сухого ферментного препарата пенициллопепсина на основе штамма <i>P. canescens</i> Pep-4	83
3.2.2 Получение сухого ферментного препарата пенициллопепсина и лейцинаминопептидазы на основе штамма <i>P. canescens</i> RN3-11-7-7	85
3.2.3 Получение сухих комплексных ферментных препаратов протеаз на основе рекомбинантных штаммов <i>P. canescens</i>	87
3.3 Масштабирование процесса культивирования рекомбинантных штаммов в условиях промышленного производства	89
3.4 Свойства и состав ферментных препаратов, полученных с помощью новых рекомбинантных штаммов <i>P. canescens</i>	92
3.4.1 pH и температурные оптимумы целевых активностей	92
3.4.2 Термостабильность ферментов	93
3.4.3 Компонентный состав ферментных препаратов	95
3.5 Прикладные испытания новых ферментных препаратов, полученных с помощью рекомбинантных штаммов	100
3.5.1 Исследование эффективности применения ферментного препарата пенициллопепсина и лейцинаминопептидазы для интенсификации спиртового брожения.....	100
3.5.2 Результаты испытаний <i>in vitro</i> ферментного препарата Пенициллопепсина в качестве кормовой добавки на зерновом сырье	104
3.5.3 Результаты испытаний <i>in vitro</i> ферментных препаратов сериновой протеазы <i>P. canescens</i> в качестве кормовой добавки на соевом сырье	107
3.5.4 Результаты испытаний <i>in vivo</i> комплексных ферментных препаратов по влиянию на продуктивность и физиологическое состояние свиней при откорме	111

3.5.4.1 Расчет экономической эффективности производства свинины с использованием новых ферментных препаратов в составе комбикормов.....	114
ВЫВОДЫ	117
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	121
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	137

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В настоящее время пищевая и перерабатывающая промышленность Российской Федерации является одной из стратегических отраслей экономики, обеспечивающей население страны необходимыми качественными продуктами питания. В России разработана и реализуется Стратегия развития пищевой и перерабатывающей промышленности Российской Федерации на период до 2020 года, нацеленная на создание необходимых условий для модернизации промышленности, формирование нового технологического уклада, повышение технического уровня производства за счет использования современных достижений научно-технического прогресса, а также решение проблемы импортозамещения. Среди поставленных задач – необходимость внедрения новых технологий в отрасли пищевой и перерабатывающей промышленности, в том числе биотехнологий, позволяющих значительно расширить выработку продуктов нового поколения с заданными качественными характеристиками, повысить глубину переработки, что позволит увеличить выход готовой продукции с единицы перерабатываемого сырья [1].

Одним из видов сырья пищевой промышленности является белоксодержащее растительное сырье. Для его эффективной конверсии широко используются протеолитические ферментные препараты (ФП), однако большинство из них выпускаются зарубежными производителями. Применение протеаз с различной специфичностью действия позволяет повысить пищевую и кормовую ценность сырья, улучшить его технологические свойства, повысить качество и увеличить выход готовой продукции, а также снизить ее себестоимость [2–4].

Одним из крупномасштабных потребителей ферментов микробного происхождения является спиртовая отрасль, перерабатывающая более 2 млн. тонн зерна в год [5]. Перспективным направлением интенсификации спиртового производства является гидролиз зернового белка. Обработка сусла кислыми протеазами повышает атакуемость крахмала зерна амилолитическими

ферментами за счет разрушения углеводно-протеиновых связей и обеспечивает дрожжи легкоусвояемым азотистым питанием. Использование комплекса грибных протеаз эндо- и экзодействия позволяет сократить время сбраживания и снизить степень белкового загрязнения оборудования. Таким образом, применение протеаз позволяет интенсифицировать процесс дрожжегенерации и брожения, что способствует увеличению выхода этилового спирта, в том числе, пищевого [5, 6].

В последнее время активным потребителем микробных протеаз также становится рынок кормовых ферментов. Использование ФП протеолитического действия позволяет заменять дорогостоящие компоненты кормовых рационов более дешевыми зерновыми и бобовыми культурами, повышает питательную ценность и усвояемость кормов, облегчает соблюдение санитарно-гигиенических норм их содержания и повышает продуктивность животных. Применение протеолитических ферментов позволяет снизить затраты на производство мяса сельскохозяйственных животных и птицы, повысить конкурентоспособность продукции [7, 8]

Перспективными продуцентами коммерческих комплексных протеолитических ФП, в том числе, аспартатных (кислых) протеаз и экзопептидаз, являются мицелиальные грибы, которые характеризуются высокой продуктивностью и способностью к синтезу широкого спектра гидролитических ферментов при культивировании на относительно дешевых ферментационных средах, что существенно удешевляет процесс получения ФП. В настоящее время на российском рынке ассортимент отечественных ФП грибных протеаз ограничен в связи с их высокой стоимостью – для организации рентабельного производства таких ФП необходимы высокоактивные штаммы-продуценты, способные к биосинтезу требуемого комплекса целевых ферментов [9, 10].

В данной работе для получения высокоактивного рекомбинантного продуцента комплекса протеолитических и сопутствующих ферментов был использован штамм-реципиент *Penicillium canescens* RN3-11-7 *niaD⁻*, ранее успешно применявшийся для получения высокоактивных рекомбинантных

продуцентов карбогидраз в ФИЦ Биотехнологии РАН [11]. Следует отметить, что этот штамм синтезирует собственный комплекс гемицеллюлаз, в первую очередь, ксиланазу и β -глюканазу, что является дополнительным преимуществом при обработке растительных субстратов, в частности, в пищевых производствах.

Работа посвящена созданию высокоактивных продуцентов протеолитических ферментов на основе штамма *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻, обладающего собственной гемицеллюлолитической активностью, что позволит получить конкурентоспособные комплексные ФП для повышения эффективности биотехнологических процессов переработки растительного белоксодержащего сырья в пищевой и кормовой отраслях агропромышленного комплекса (АПК).

Целью данной работы была интенсификация технологических процессов и повышение выхода и качества продукции пищевой (спиртовой) промышленности и других отраслях АПК за счет применения полученных на основе высокоактивных рекомбинантных штаммов *P. canescens* новых отечественных комплексных ФП, содержащих протеазы с широкой специфичностью действия, а также гемицеллюлазы.

В соответствии с этой целью были поставлены следующие **задачи**:

- Осуществить трансформацию штамма-реципиента *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻ плазмидами, несущими гены кислой аспаргатной протеазы, грибной сериновой протеазы и лейцинаминопептидазы.
- Провести скрининг трансформантов, выделить их высокоактивные варианты.
- Получить на основе новых штаммов комплексные препараты протеаз и гемицеллюлаз и изучить их свойства и компонентный состав.
- Провести производственные испытания по наработке промышленных ФП на основе новых штаммов.
- Исследовать гидролитические свойства новых ФП по отношению к различным видам белоксодержащего растительного сырья для интенсификации технологических стадий спиртового и других производств за счет использования новых ФП.

Научная новизна. Впервые для получения новых продуцентов протеаз для трансформации реципиентного штамма *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻ были успешно использованы векторные конструкции, содержащие гены ферментов протеолитического комплекса – кислой аспартатной протеазы, сериновой протеазы и лейцинаминопептидазы.

Впервые методами генной инженерии получены новые продуценты комплексных ФП протеолитического и гемицеллюлолитического действия.

Изучены физико-химические свойства новых комплексных препаратов протеаз и гемицеллюлаз, компонентный состав этих препаратов, а также их эффективность при обработке различных видов белоксодержащего растительного сырья в опытах *in vitro* и *in vivo*.

Научно-практическая значимость работы. Созданы новые рекомбинантные продуценты на основе штамма-реципиента *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻, обеспечивающие получение высокоактивных комплексных ФП с широкой специфичностью действия, обладающих различными видами протеолитической и гемицеллюлолитической активности.

Проведено успешное внедрение технологии производства комплексных ФП и получены промышленные партии ФП с использованием новых рекомбинантных штаммов *P. canescens* – продуцентов протеаз и гемицеллюлаз в условиях завода ООО «Агрофермент» (Тамбовская обл.). На основании результатов лабораторных испытаний эффективности действия новых ФП на белоксодержащее растительное сырье показана перспективность применения протеолитического комплекса в спиртовой промышленности, а также в качестве кормовых добавок для сельскохозяйственных животных и птицы.

Полученные результаты имеют большое практическое значение для осуществления промышленного производства отечественных ФП и обеспечения эффективного импортозамещения в пищевой промышленности и других отраслях АПК.

Показана эффективность нового комплексного препарата, содержащего эндо- и экзопептидазы, при сбраживании пшеничного сусла в производстве этанола в результате интенсификации процесса дрожжегенерации.

Проведены успешные испытания промышленных партий комплексных ФП в условиях племзавода «Орловский» (Тамбовская обл.) в составе комбикормов при откорме свиней. Показано положительное влияние кормовых добавок на продуктивность, физиологическое состояние животных и качественные показатели мяса и шпика, а также на увеличение прибыли.

Научно-практическая новизна технических решений подтверждена 2 патентами РФ.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Созданы методами генетической инженерии новые стабильные высокоактивные рекомбинантные штаммы-продуценты грибных протеаз с различной специфичностью действия: *P. canescens* *Pep-4* – продуцент кислой аспартатной протеазы – пенициллопепсина; *P. canescens* *RN3-11-7-7* – пенициллопепсина и лейцинаминопептидазы; *P. canescens* *Oryzin-25* – грибной сериновой протеазы – оризина. Новые штаммы характеризуются тем, что базовый уровень биосинтеза собственного комплекса гемицеллюлаз штамма *P. canescens* практически не изменился.

2. Технология производства комплексных ФП протеаз и гемицеллюлаз успешно масштабирована в условиях завода ООО «Агрофермент», что обеспечило получение промышленных партий этих ФП.

3. Новые штаммы-продуценты позволили обеспечить содержание рекомбинантных протеаз в промышленных ФП ПЕП (пенициллопепсин) и ПЕП-ЛАП (пенициллопепсин и лейцинаминопептидаза) и лабораторном ФП Оризин 20–25% от общего пула белка, ксиланазы – 15–20%, α -L-арабинофуранозидазы и арабиноксилан-арабинофураногидролазы – 25–30%, β -1,3-глюканы – 2–5%, т.е. получить комплексные ФП, в состав которых входят протеазы и гемицеллюлазы.

4. ФП протеолитического действия ПЕП-ЛАП (пенициллопепсин и лейцинаминопептидаза) успешно использован для интенсификации процесса

дрожжегенерации спиртового производства и увеличения выхода спирта из пшеничного сусла по сравнению с контролем.

5. Комплексные ФП протеаз и гемицеллюлаз успешно использованы в качестве кормовых добавок для откормочного молодняка свиней.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертация соответствует пунктам 4, 7 и 15 паспорта специальности 05.18.07 – «Биотехнология пищевых продуктов и биологически активных веществ».

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов диссертационного исследования и сделанных выводов подтверждается использованием современных методов исследований, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, подкреплены данными, представленными в таблицах и рисунках. Статистическую обработку данных проводили с доверительной вероятностью 0,95 в программе Microsoft Office Excel.

Личный вклад диссертанта. Автор лично проводил сбор и анализ литературных данных, осуществлял планирование и проведение научных экспериментов, обработку и интерпретацию полученных данных, а также подготовку материалов научных публикаций.

Апробация результатов работы. Результаты работы представлены на российских и международных конференциях и симпозиумах: 7 и 8 Московских международных конгрессах «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2013, 2015); International Conferences «Biocatalysis-2013» и «Biocatalysis-2015: fundamentals and applications» (Москва, 2013, 2015); II Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и аспирантов «Научное обеспечение инновационных технологий производства и хранения сельскохозяйственной и пищевой продукции» (Краснодар, 2014); VII Международном научно-практическом симпозиуме «Перспективные биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов» (Москва, 2014); IX Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2015); 8-м

Международном научно-практическом симпозиуме «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов» (Москва, 2016); V съезде физиологов СНГ и V съезде биохимиков России (Дагомыс, 2016); V международной научно-практической конференция «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2017); Научно-практическом семинаре «Современные биотехнологические процессы, оборудование и методы контроля в производстве спирта и спиртных напитков» (Москва, 2017).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, 2 статьи в других научных изданиях, а так же 6 тезисов и 5 статей в сборниках материалов конференций, получено два патента РФ.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1.1 Протеолитические ферменты

Протеолитические ферменты классифицируют по трем основным критериям: по типу катализируемой реакции; по механизму катализа в активном центре; по гомологии аминокислотной (а.к.) последовательности каталитического домена, отражающей эволюционное родство. Комитетом по номенклатуре Международного союза биохимиков и молекулярных биологов (NC-IUBMB) принят основной принцип классификации ферментов – тип катализируемой реакции [12].

В классификации ферментов, выделен класс гидролаз КФ 3, к подклассу КФ 3.4 которого относятся все протеолитические ферменты, или протеазы (они же – протеиназы, *устаревшее название*). Протеазы – ферменты гидролитического действия, катализирующие гидролиз белков и пептидов за счет расщепления пептидных связей. Протеазы разделяются на 14 субподклассов по типу катализируемых реакций (таблица 1), объединённые в две большие группы: *экзопептидазы*, расщепляющие пептидную связь только в концевых областях полипептида (субподклассы КФ 3.4.11-19), и *эндопептидазы*, действующие на связи внутри полипептидной цепочки (субподклассы КФ 3.4.21-24 и КФ 3.4.99) [12, 13].

Таблица 1 – Классификация протеаз по типу катализируемой реакции [10]

Индекс КФ	Группа протеаз	Механизм действия
<i>Экзопептидазы</i>		
3.4.11	Аминопептидазы	Действуют на N-конец полипептидной цепи, высвобождая аминокислотный остаток
3.4.13	Дипептидазы	Действуют только на дипептиды
3.4.14	Дипептидил-пептидазы	Действуют на N-конец полипептидной цепи, высвобождая дипептид

Индекс КФ	Группа протеаз	Механизм действия
	Трипептидил-пептидазы	Действуют на N-конец полипептидной цепи, высвобождая трипептид
3.4.15	Пептидил-дипептидазы	Действуют на С-конец полипептидной цепи, высвобождая дипептид
3.4.16	Карбоксипептидазы (сериновые)	Действуют на С-конец полипептидной цепи (Содержат серин в активном центре)
3.4.17	Металлокарбоксипептидазы	Действуют на С-конец полипептидной цепи (Протеазы, содержащие в активном центре ионы металлов)
3.4.18	Карбоксипептидазы (цистеиновые)	Действуют на С-конец полипептидной цепи (Содержат цистеин в активном центре)
3.4.19	Омегапептидазы	Высвобождают модифицированные концевые остатки
<i>Эндопептидазы</i>		
3.4.21	Сериновые эндопептидазы	Действуют на связи внутри полипептидной цепи (Содержат серин в активном центре)
3.4.22	Цистеиновые эндопептидазы	Действуют на связи внутри полипептидной цепи (Содержат цистеин в активном центре)
3.4.23	Аспартатные эндопептидазы	Действуют на связи внутри полипептидной цепи (Содержат аспартат в активном центре)
3.4.24	Металлоэндопептидазы	Действуют на связи внутри полипептидной цепи (Протеазы, содержащие в активном центре ионы металлов)
3.4.25	Треониновые эндопептидазы	Действуют на связи внутри полипептидной цепи (Содержат треонин в активном центре)
3.4.99	Эндопептидазы с неизвестным механизмом катализа	-

Существует альтернативная классификация протеаз по базе данных MEROPS, которая была основана в 1993 году и создана, как база данных в интернете в 1996 году [14]. Классификация MEROPS имеет иерархический порядок. В зависимости от механизма действия и строения активного центра выделяют шесть классов протеолитических ферментов: А – аспартатные, S – сериновые, C – цистеиновые, G – глутаминовые, T – треониновые, M – металлопептидазы и U – пептидазы с неизвестным механизмом катализа. Протеазы объединены в семейства, на основании гомологии аминокислотных последовательностей, а семейства в свою очередь объединены в кланы, на основании эволюционного происхождения и укладки молекулы [14–16].

1.1.1 Экзопептидазы

Экзопептидазы представляют собой ферменты, последовательно расщепляющие пептидные связи, ближайшие к амино- или карбоксильному концу молекулы субстрата [3] (рисунок 1).



Рисунок 1 – Механизм действия экзопептидаз

Экзопептидазы классифицируются, главным образом, на основании их механизма действия на субстрат: аминопептидазы, карбоксипептидазы, дипептидазы и омегапептидазы.

Аминопептидазы или α -аминоацилпептидгидролазы действуют на свободный N-конец полипептидной цепи, высвобождая отдельные

аминокислотные остатки, ди- и трипептиды. Большинство аминопептидаз относится к металлоферментам, для каталитического действия, которых необходимо присутствие в активном центре катионов таких металлов, как цинк, кобальт, марганец, магний или кальций. Аминопептидазы широко распространены среди бактерий, грибов, растений и млекопитающих [17, 18]. Они специфически отщепляют аминоконцевой остаток полипептидной цепи и включены в метаболизм биологически активных пептидов, таких как гормоны, нейромедиаторы, пищевые пептиды. Они участвуют также в таких биологических процессах, как активация и созревание белков, удаление аномальных белков [19]. Эти ферменты экспрессируются как мембранные или цитозольные, либо могут секретироваться из клеток. Специфичность аминопептидаз определяется способностью гидролизовать кислые, основные или нейтральные N-концевые остатки [2].

Одной из наиболее известных и широко применяемых аминопептидаз является лейцинаминопептидаза (ЛАП), которая предпочтительно катализирует гидролиз остатков лейцина с amino-конца белковых или пептидных субстратов [20]. В микроорганизмах ЛАП являются транскрипционными репрессорами для контроля биосинтеза пиримидина и токсинов, а также для сайт-специфичных рекомбинаций в плазидах и фагах. ЛАП являются цинк-зависимыми металлопептидазами. Некоторым ЛАП для максимальной активности требуется катион кобальта. pH-оптимум действия большинства ЛАП находится в зоне pH 6,0–9,0 [21]. Как правило, микробные ЛАП являются внутриклеточными, однако внеклеточные ферменты были обнаружены в мицелиальных грибах, в частности, в *A. oryzae*. Некоторые ЛАП отличаются повышенной термостабильностью, молекулярная основа которой заключается в нескольких минорных модификациях, таких как стабилизация пептидных концов белка или замещение водородных связей, требующихся для поддержания структуры, ионными связями с более высокой энергией [22].

Способность грибных аминопептидаз высвобождать отдельные N-концевые аминокислоты, так же, как и их термостабильность, делает их перспективными

для контроля степени гидролиза и развития вкуса различных белковых субстратов [23]. Так как интенсивность горечи пептида пропорциональна количеству гидрофобных аминокислот на его N-конце, ЛАП используют для удаления единичных или пары гидрофобных аминокислот с N-конца полипептидной цепи при снятии горечи белковых гидролизатов [24]. ЛАП также усиливают вкус за счет высвобождения аминокислот [25]. Аминопептидазы придают характерную текстуру и вкус тесту, мясу и сыру [26]. ЛАП используются при производстве сыра, в хлебопечении и при приготовлении соевых гидролизатов [27].

Карбоксипептидазы действуют на С-конец полипептидной цепи с высвобождением отдельных аминокислот или дипептидов. По структуре активного центра карбоксипептидазы делят на три основные группы: сериновые, металлокарбокси- и цистеиновые. Сериновые карбоксипептидазы, выделенные из *Penicillium spp.*, *Saccharomyces spp.* и *Aspergillus spp.*, сходны по субстратной специфичности, но несколько отличаются по другим свойствам, таким как рН оптимум, стабильность, молекулярный вес и отношение к действию ингибиторов. Для активности металлокарбоксипептидаз из *Saccharomyces spp.* и *Pseudomonas spp.* необходимо присутствие катионов цинка и кобальта [2, 28].

Дипептидазы специфично расщепляют пептидные связи на свободные аминокислоты только в дипептидах. К ним относятся дипептидаза А и мембранные дипептидазы [14].

Омегапептидазы образуют группу экзопептидаз, которые не имеют предпочтений в отношении свободного N- или С-конца в субстрате. Несмотря на отсутствие потребности в заряженной концевой группе, они часто действуют близко к одному или другому концу, и, таким образом, совершенно отличны от эндопептидаз. Омегапептидазы удаляют концевые замещенные, циклические или связанные изопептидной связью (отличной от связи между α -карбокси и α -аминогруппами) аминокислотные остатки. Примеры омегапептидаз – убиквитин гидролазы, пептидил-глицинамидаза, пироглутамил-пептидазы, N-формилметирил-пептидаза и гамма-глутамил гидролазы [12, 14].

1.1.2 Эндопептидазы

Эндопептидазы предпочтительно гидролизуют пептидные связи на внутренних участках полипептидной цепи (рисунок 2).

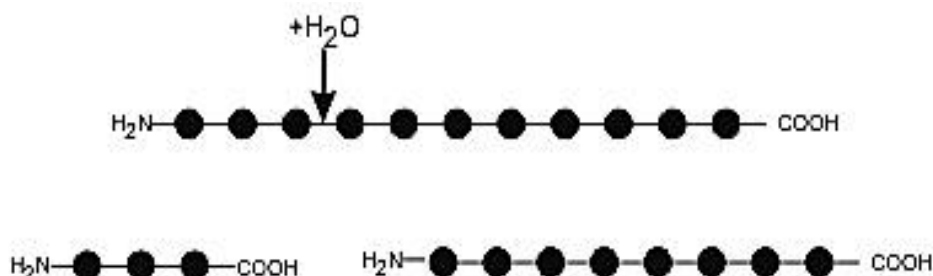


Рисунок 2 – Механизм действия эндопептидаз

Разделение эндопептидаз на подгруппы, прежде всего, основано на структуре каталитического центра. По данному признаку их делят на пять подгрупп: сериновые, цистеиновые, аспартатные, треониновые и металлоэндопептидазы.

Сериновые эндопептидазы (КФ 3.4.21) составляют около трети всех известных протеаз и участвуют во многих биологических процессах [29]. Они содержат в активном центре триаду а.о.: серин (Ser, нуклеофил), аспарагиновую кислоту (Asp, электрофил) и гистидин (His, основание). Нуклеофильная сериновая группа в активном центре необходима для связывания с субстратом и расщепления пептидной связи [30]. Сериновые протеазы характеризуются широкой субстратной специфичностью, проявляют пептидазную, эстеразную и амидазную активности. Активны в нейтральной и щелочной зоне рН с оптимумом рН 7,0–11,0 [3]. Сериновые протеазы катализируют двустадийную реакцию гидролиза с образованием ковалентно-связанных промежуточных комплексов фермент-пептид, при этом происходит потеря аминокислоты или фрагмента пептида. За этапом ацилирования следует процесс деацилирования, заключающийся в нуклеофильной атаке промежуточного продукта водой, в

результате чего происходит гидролиз субстрата [2]. Серин активного центра большинства сериновых протеаз ингибируется диизопропилфторфосфатом (ДФФ) и фенилметансульфонилфторидом (ФМСФ) [31]. Эти ингибиторы так же используются для установления принадлежности протеаз к сериновому типу. Однако ДФФ неудобен в использовании из-за его токсичности, поэтому чаще всего используют ФМСФ, так как в растворенном состоянии он малотоксичен [12].

По базе данных MEROPS сериновые протеазы разделяют на 37 семейств, которые сгруппированы в 13 кланов [14]. Наиболее широко распространены сериновые эндопептидазы двух основных кланов: химотрипсин-подобные (клан PA), включающие около 300 протеаз [30], и субтилизин-подобные (клан SB), включающие 91 протеазу. Структура активного центра данных эндопептидаз аналогична, но трехмерные структуры различаются, что указывает на их конвергентную эволюцию. Химотрипсин-подобные ферменты уложены в двойную β -бочку, а субтилизин-подобные ферменты имеют трехслойную структуру β -сэндвич [32].

Основными представителями клана PA являются химотрипсины (семейство S1), составляющие самую большую группу протеаз [33]. Каталитическая триада аминокислот для протеаз семейства S1 имеет следующий порядок His/Asp/Ser [34]. Характерным признаком химотрипсинов является наличие дисульфидных мостиков, способствующих поддержанию правильной конформации молекулы фермента [35]. Биологическая роль химотрипсин-подобных протеаз разнообразна, среди них – ферменты пищеварения (трипсин, химотрипсин, эластаза) [12].

Вторую по величине группу сериновых протеаз составляют субтилизины (клан SB), представляющие собой секреторные ферменты, устойчивые и активные в щелочной области pH. В аминокислотном составе молекул субтилизинов преобладают гидрофобные аминокислоты [32, 36]. Субтилизины проявляют широкую субстратную специфичность, предпочтительно расщепляют связи после гидрофобных а.о. Большинство известных субтилизинов представляют собой мультидоменные полипептиды, состоящие из протеазного домена и одного или

двух сопутствующих, что также объясняет разнообразие их функций [33]. Клан SB представлен ферментами двух семейств – субтилизина (S8) и седолизина (S53). Механизм катализа этих семейств различен. Так, представители семейства субтилизина имеют отличный от сериновых протеаз порядок каталитических а.о. – Asp/His/Ser, а седолизины содержат каталитическую тетраду Glu/Asp/Asp/Ser [12, 20]. Наиболее широко распространено семейство субтилизина (S8) – неспецифические эндопептидазы, к которым относится бактериальная сериновая эндопептидаза субтилизин (КФ 3.4.21.62) и ее гомологи. Большинство пептидаз из этого семейства синтезируется в виде пре-проферментов, которые проходят через клеточную мембрану с помощью сигнального пептида и активируются за счет отщепления пропептида. Они имеют широкий спектр биологических функций, в частности, участвуют в процессах питания и процессинге белка [29]. Наиболее известными представителями семейства S8 являются субтилизин Карлсберг, продуцируемый *Bacillus licheniformis*, и субтилизин BPN (или субтилизин Novo), синтезируемый *B. amyloliquefaciens* [2, 37].

Большинство грибных сериновых протеаз относится к протеазам субтилизинового типа [38]. Наиболее известной сериновой протеазой мицелиальных грибов, особенно грибов рода *Aspergillus*, является оризин (КФ 3.4.21.63). По каталитическим свойствам и гомологии вблизи активного центра оризин принадлежит к семейству субтилизина (S8). Оризин гидролизует эластин, коллаген и другие субстраты типичные для субтилизинов. Оптимум действия находится в щелочной зоне pH от 8,0 до 10,0. Первичный продукт трансляции содержит сигнальный пептид из 21 а.к. остатка и пропептид из 10 а.к. остатка (у *A. oryzae*). После процессинга образуется активный «зрелый» пептид [39].

Цистеиновые (тиоловые) эндопептидазы содержат в активном центре остатки цистеина и гистидина, обуславливающие их каталитическую активность. Тиоловые протеазы ингибируются парахлормеркурибензоатом, монойодуксусной кислотой и другими окислителями, а также катионами тяжелых металлов [4, 39]. Активируются восстановителями (2-меркаптоэтанолом, дитиотреитолом, цистеином, бисульфитом натрия и пр.) [39]. Большинство цистеиновых протеаз

имеют слабокислый или нейтральный pH-оптимум, однако некоторые из них, например, лизосомальные протеазы, проявляют максимальную активность в кислой зоне pH. К данному подклассу относится ряд важных протеаз растительного происхождения, таких как папаин, фицин, бромелаин, химопапаины А и В, и некоторые микробные протеазы [3, 28]. Папаин, бромелаин, фицин – протеазы широкой субстратной специфичности. Они гидролизуют в белках пептидные связи, образованные лейцином или глицином. Другие типы связей, в том числе характерные для специфичности пепсина, трипсина, химотрипсина, карбоксипептидазы, также могут расщепляться, хотя и с меньшей скоростью. В мицелиальных грибах их находят редко. Микробные тиоловые протеазы наиболее активны при pH 7,0–8,8 [3, 4].

Металлоэндопептидазы содержат в активном центре катионы двухвалентных металлов (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} или Co^{2+}) [40]. Металлопротеазы включают ферменты различного происхождения, такие как коллагеназы высших микроорганизмов, геморрагические токсины змеиного яда, термолизин бактерий и др. Встречаются как нейтральные металлопротеазы с оптимумом активности при pH 7,0–8,0, проявляющие специфичность к гидрофобным аминокислотам, так и щелочные с pH-оптимумом 9,0 и более широкой субстратной специфичностью. Наиболее известными и широко используемыми металлопротеазами являются термолизин, коллагеназа и эластаза макрофагов (металлоэластаза EC 3.4.24.65) [3]. Все металлопротеазы ингибируются хелатными агентами (EDTA, EGTA, о-фенантролином и др.). Инактивация чаще всего носит обратимый характер [12].

Треониновые эндопептидазы содержат в активном центре остатки треонина. Представители этого класса входят в состав относительно хорошо охарактеризованного протеолитического комплекса – протеасомы [34]. Наиболее широко распространены треониновые пептидазы семейств T1-3 [14].

Аспартатные эндопептидазы содержат в активном центре диаду остатков аспарагина, один из которых – в ионизированной форме, другой – в протонированной. Катализ аспартатных протеаз идет по общему кислотно-основному механизму. Каталитическая диада, проявляя основные свойства,

активирует молекулу воды, принимая на себя протон. Активированная молекула воды, выступающая в роли нуклеофила, атакует карбонильный атом углерода расщепляемой пептидной связи [12]. К аспартатным протеазам относят ряд гомологичных протеаз: пепсин, химозин, ренин, катепсин D и родственные ферменты. За исключением ренина, оптимум их активности находится в зоне кислых pH (от 3,0 до 4,0), молекулярные массы составляют от 30 до 45 кДа [41, 42]. Молекулы аспартатных протеаз состоят из двух субъединиц в форме «лопастей», разделенных в области активного центра [43]. Аспарагиновая кислота активного центра находится внутри последовательности Asp-X-Gly, где X может быть представлен серином или треонином в протеазах семейства пепсина и аланином в ренин-подобных протеазах [41]. Аспартатные протеазы обратимо ингибируются пепстатином [12].

Микробные аспартатные протеазы можно разделить на две группы: пепсин-подобные протеазы, продуцируемые *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* и *Neurospora*, и ренин-подобные ферменты, продуцируемые *Endothia* и *Mucor spp.*, а именно *Mucor miehei*, *M. pusillus*, и *Endothia parasitica* [3, 4, 28].

По базе данных MEROPS аспартатные протеазы разделяют на 16 семейств, которые сгруппированы в 6 кланов. Самую большую группу аспартатных протеаз образует семейство пепсина (A1) [14]. Пепсин-подобные протеазы являются одноцепочечными двухдоменными ферментами, содержат около 330–350 а.о. и имеют сходную первичную структуру. Консервативный сегмент составляет до 5% последовательности аспартатных протеаз. Два консервативных участка содержат остатки аспарагиновой кислоты, находятся в активном сайте фермента и включены в механизм катализа [44]. Аминокислотная последовательность пепсинов начинается 30–35 остатками, за которыми следуют два гидрофобных остатка. За гидрофобными остатками следует консервативная последовательность Asp-Thr-Gly, присутствующая во всех аспартатных протеазах. Asp-Thr-Gly находится внутри большой «лопасти», известной как Psi-loop (петля). Через примерно 45 а.о. после Asp-Thr-Gly находится консервативный тирозин. Еще через 45 а.о. находится последовательность Leu-Gly-Ile, за которой следуют более

90 а.о. Далее последовательность в некоторой степени повторяется. Два гидрофобных а.о. снова встречаются перед последовательностью Asp-Thr-Gly. Перед последовательностью Leu-Gly-Asp – более 85 а.о. От 20 до 30 аминокислот составляют остальную часть первичной структуры пепсин-подобных протеаз [45, 46]. Консервативный тирозин имеет большое значение, т.к. помогает определять активные сайты, где происходит связывание с субстратом. В последовательностях Leu-Gly-Ile и Leu-Gly-Asp присутствует глицин, так как, ввиду структурных особенностей, он может легко пройти через Psi-loop. Благодаря громоздкости остатков лейцина, изолейцина и аспарагиновой кислоты, Psi-loop закреплена на месте [47].

Пепсин, как и другие аспартатные протеазы, наиболее часто синтезируется в виде неактивного зимогена – пепсиногена, содержащего дополнительные 44 а.о. на N-конце белка [45]. Пропептид образует спиралевидную структуру, которая стабилизируется электростатическими силами за счет образования ионных пар между основными а.о. пропептида и карбоксильными боковыми цепочками пепсина. Пропептид ингибирует активность фермента, т.к. его сегмент блокирует доступ к каталитическим аспарагинам в активном сайте. Удаление пропептида приводит к образованию активного пепсина [48]. Потеря спиралевидной структуры также обычно приводит к активации зимогена [45]. При снижении pH происходит протонирование карбоксильных боковых цепочек, что приводит к разрушению комплекса и образованию активного фермента. Продолжительное выдерживание пепсина в зоне низких pH приводит к необратимой активации фермента [48].

Пепсин характеризуется широкой субстратной специфичностью и способен расщеплять пептидные связи между гидрофобными а.о. [49]. В результате гидролиза белковых субстратов пепсином образуются, преимущественно, мелкие пептиды от 3 до 30 а.о. Несмотря на широкую специфичность, пепсин дает воспроизводимый выход продуктов, т.е. при одинаковых условиях гидролиза белка образуются одинаковые пептиды. С наибольшей скоростью пепсин

гидролизует пептидные связи, образованные ароматическими а.к. – тирозином, триптофаном и фенилаланином [42, 45, 50].

1.2 Применение протеолитических ферментов при гидролизе растительного белоксодержащего сырья

1.2.1 Основные виды белоксодержащего растительного сырья

Растительный белок имеет высокую биологическую ценность благодаря своим питательным свойствам и низкому содержанию жира [51]. Растения обладают способностью к быстрому воспроизводству за счет фотосинтеза, что делает их перспективным источником пищевого и кормового белка [52].

В настоящее время, основным промышленным источником растительного белка остается соя [53]. Второе место занимает пшеница, далее следуют другие зерновые, зернобобовые и масличные культуры. Значение пшеницы в пищевой промышленности и кормопроизводстве будет возрастать, поскольку она представляет собой питательную и экономически выгодную продовольственную культуру, адаптированную к различным климатическим условиям и типам почвы [54].

1.2.1.1 Характеристика зернового сырья

Строение зерна

Зерно различных злаков имеет сходный анатомический и химический состав. Соотношение частей зерна пшеницы (рисунок 3) составляет (% от массы): зародыш – 2–4, плодовые и семенные оболочки – 10–17, эндосперм – 80–85 [55].

Оболочки (внешние слои зерна) состоят из нескольких слоев, которые защищают основную часть зерна от внешних воздействий среды и делятся на плодовую (околоплодник) и семенную. *Плодовые оболочки*, образовавшиеся из стенок завязи, состоят из нескольких слоев клеток: наружный слой – эпикарпий

(продольные клетки), мезокарпий (поперечные клетки) и эндокарпий (трубчатые клетки). В целом масса плодовых оболочек составляет 4–6% от веса зерна. Под плодовыми оболочками лежат *семенные оболочки*, которые состоят из двух слоев клеток: верхний (пигментный) и внутренний (гиалиновый). Семенные оболочки относительно легки, масса их составляет 2–2,5% от всего зерна [55, 56].

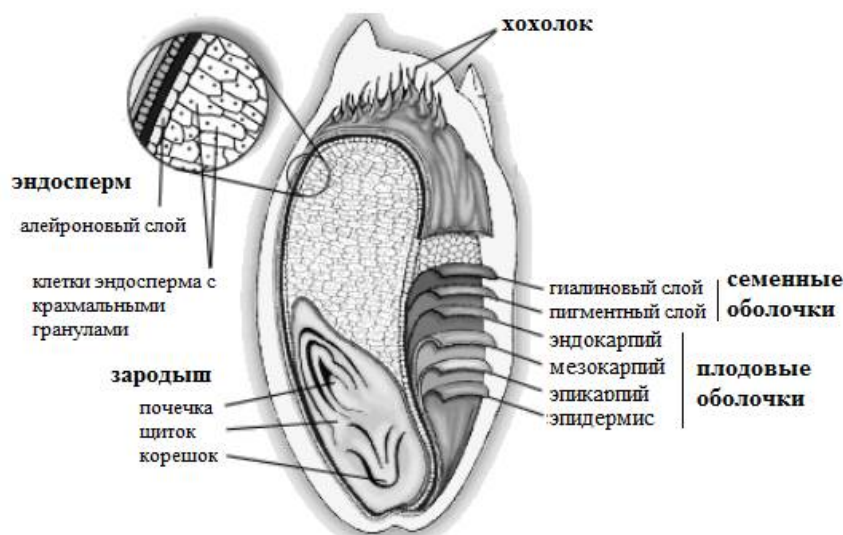


Рисунок 3 – Строение зерна пшеницы (адаптировано из [56])

Под оболочками расположен эндосперм. Наружный эндосперм – алейроновый слой, состоит из резко очерченных, крупных клеток кубической формы с сильно утолщенными стенками. Алейроновый слой у одних культур (пшеница, рожь, овес) состоит из одного ряда, у других (ячмень) – из нескольких рядов клеток [55]. Расположенные под алейроновым слоем крупные тонкостенные клетки разнообразной формы занимают всю внутреннюю часть эндосперма. Эти клетки заполнены крахмальными зёрнами различной величины, в промежутках между ними находятся белковые вещества. Внутреннюю часть эндосперма называют также мучнистым или крахмалистым эндоспермом. Эндосперм содержит, в основном, запасы питательных веществ, которые необходимы для развития из зародыша молодого растения [55, 56].

Зародыш находится на остром конце зерна. В нижней части зародыша расположен его зародышевый корешок, а в верхней части – зародышевая почечка. Часть зародыша, плотно прилегающая к эндосперму, – щиток, который и служит для передачи питательных веществ из эндосперма в зародыш при прорастании зерна [55].

Химический состав зерна

Белки. Белок считается самым важным питательным веществом для человека и животных. Среднее содержание белка в зерновых культурах составляет 8–11%, однако, разброс предельных значений в различных культурах может быть весьма ощутимый – зерна пшеницы, например, могут содержать от 6% до 20% белка. Белки зерновой муки разделяют на четыре фракции (альбумины, глобулины, проламины и глютелины) в зависимости от их растворимости [57]. Классификация основана на классической работе Осборна:

- Альбумины – растворимы в воде;
- Глобулины – нерастворимы в воде, но растворимы в разбавленных водных растворах хлорида натрия и нерастворимы при высоких концентрациях хлорида натрия;
- Проламины – растворимы в 60–70% этиловом спирте;
- Глютелины – растворимы в разбавленной кислоте или растворе гидроксида натрия [56].

Белки зародыша и алейронового слоя представлены в основном альбуминами и глобулинами, выполняющими каталитическую функцию при прорастании зерна (ферменты). Они входят в состав мембран органелл зерна, образуют рибосомы, митохондрии, эндоплазматический ретикулум, являются составной частью сложных белков – нуклеопротеидов, липопротеидов, фосфопротеидов. Большую часть белков эндосперма злаковых культур (70–90%) составляют запасные белки: проламины и глютелины [58]. Их основная биологическая функция – снабжение семени азотом и аминокислотами в период прорастания. Проламины разных злаков имеют родовые названия: глиадин (пшеница), секалин (рожь), гордеин (ячмень), авенин (овес), зеин (кукуруза) и

оризин (рис). Глютелин пшеницы имеет название глютенин. Глиадины и глютенины пшеницы образуют термин глютен (или клейковина) [56, 57]. Клейковина пшеницы является одним из факторов, определяющих следующие характеристики муки: его упругость и эластичность при смешивании с водой. Клейковина входит в состав и других злаковых культурах, таких как рожь, ячмень и овес.

В состав белков входят также склеропотеины (нерастворимые белки), содержащиеся в оболочках и периферических слоях зерна. Особенностью белков данной фракции является прочное соединение с лигнино-полисахаридным комплексом. Склеропотеины выполняют структурную функцию и малодоступны для пищеварения [58].

Качество белка, прежде всего, зависит от состава а.к. [59]. Практически во всех зерновых преобладает глютамин (15–31%), а затем, в случае пшеницы, ржи и ячменя, пролин (12–14%). Важными а.к. являются лейцин (7–14%) и аланин (4–11%) [57].

Углеводы. Злаки содержат 66–76% углеводов. Углеводы представлены в основном крахмалом (55–70%), далее следуют минорные компоненты, которые представлены некрахмальными полисахаридами (НКП) (~10%) и сахарами (~3%) [57].

Крахмал содержится только в эндосперме и присутствует в виде гранул. Зерновые имеют два типа гранул крахмала: большие (25–40 мкм) линзовидные и малые (5–10 мкм) сферические. Крахмал состоит из двух водонерастворимых полимеров – амилозы (25–28%) и амилопектина (72–75%). Амилоза представляет собой в основном линейные полимеры глюкозы соединенные α -(1,4)-связями. Амилопектин – разветвленный полисахарид, состоящий из связанных полимеров глюкозы с помощью α -(1,4)-гликозидных связей, которые соединены между собой α -(1,6)-гликозидными связями, которые также называются точками ветвления [56, 57].

К НКП зерна относят гемицеллюлозы (0,5–8%), целлюлозу (~2,5%) и пектиновые вещества (~1%) [57].

Гемицеллюлозы представлены *арабиноксиланами* и β -*глюканами*, эти полисахариды являются основными компонентами клеточных стенок злаковых [59]. Они так же содержатся в эндосперме. Арабиноксиланы различаются степенью ветвления и соотношением арабинозы и ксилозы. В оболочках пшеничного зерна содержится арабиноглюкуроноксилян с соотношением ксилоза:арабиноза:глюкуроновая кислота = 5:4:1 [60]. Самое высокое содержание арабиноксиланов во ржи (6–8%), в то время как пшеница содержит только 1,5–2% [57]. β -глюканы являются запасными полисахаридами и содержатся в большом количестве в ячмене (3–7%) и овсе (3,5–5%), а также в меньшем количестве во ржи (2,5%) и пшеницы (0,6%) [61]. β -глюкан в клеточных стенках образует фибриллярные структуры благодаря наличию длинных линейных участков, состоящих из β -1,4-связанных остатков глюкозы (которые β -1,3-связанными участками) [60]. β -глюканы обладают более высокой растворимостью в воде, чем арабиноксиланы; как β -глюканы, так и арабиноксиланы образуют вязкие водные растворы [57].

Липиды. В зависимости от вида зерновых содержание липидов колеблется от 1,7% (пшеница, рис) до 8% (овес). Липиды содержатся в основном в зародыше (триглицериды), в меньшей степени в алейроновом слое (триглицериды) и эндосперме (фосфо- и гликолипиды). Зерновые липиды имеют сходные составы жирных кислот, в которых 39–69% составляет линолевая кислота, а 11–36% и 18–28% – олеиновая и пальмитиновая кислоты, соответственно [57].

Витамины. Злаки содержат витамины в концентрациях от менее 1 до 50 мг/кг, в зависимости от соединения. Зерновые культуры являются хорошим источником витаминов группы В. В промышленно развитых странах они обеспечивают около 50–60% от суточной потребности витаминов. Наиболее важными жирорастворимыми витаминами являются токоферолы, которые присутствуют в концентрациях, превышающих 20 мг/кг. Витамины сосредоточены в наружных слоях зерна, в частности, в алейроновом слое, а также в зародыше [57].

Минеральные вещества. Содержание минеральных веществ в зерновых колеблется от 1,0 до 2,5%. Основная часть минералов (>90%) находится во внешних слоях зерна, а именно в оболочках и алейроновом слое [57].

1.2.1.2 Характеристика бобового сырья

Строение семян бобовых

Соотношение основных частей бобовых культур (рисунок 4) составляет (% от массы): семенная оболочка – 8,4 (6,4–11,0); семядоли – 90,0 (87,2–92,5); почечка, корешок и стебелек – 1,6 (1,1–2,8) [58].

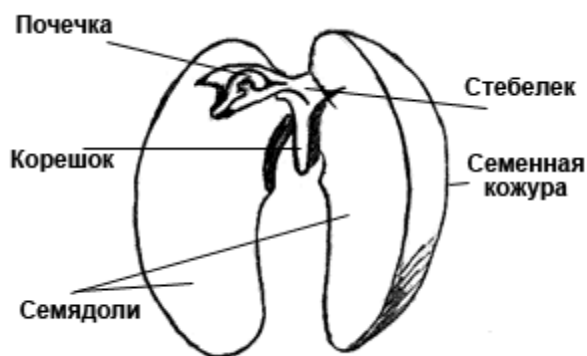


Рисунок 4 – Строение семени бобовых культур

Бобовые культуры относят к двудольным растениям. Семена бобовых растений не имеют запасной питательной ткани (эндосперма), характерной для злаковых культур. Запасные питательные вещества, необходимые для прорастания и начального роста, отложены в их зародыше и семядолях. Внутренние части семян защищает плотная кожура (семенная оболочка), снаружи покрытая кутикулой – сплошной тонкой пленкой, состоящей из кутина – вещества, не пропускающего ни воду, ни газы. Под кожурой находится зародыш семени. Он состоит из двух семядолей (первые листья), прикрепленных к укороченному стеблю. Верхняя часть стебля переходит в почечку, состоящую из зачаточных листьев, а нижняя часть заканчивается зачаточным корнем [55].

Химический состав семян бобовых

Белок семян бобовых богат незаменимыми а.к., особенно лизином, который является лимитирующей аминокислотой в растительных белках [52]. Большая часть белков бобовых культур находится в форме растворимых белков – глобулинов и альбуминов. Глобулины выполняют функцию запасных белков, состоят из 2–3 субъединиц с общей молекулярной массой от 100 до 400 кДа. Фракция альбуминов включает биологически активные белки с молекулярной массой от 10 до 100 кДа. Кроме водорастворимых белков, бобовые культуры содержат щелочерастворимые глютелины [52, 62].

Из бобовых культур в качестве источника белка наиболее широко используется соя. Почти 90% соевого белка представлено запасными структурными белками, 10% белков включает ферменты, мембранные белки, ингибиторы ферментов, лектины, обладающие способностью связывать остатки углеводов на поверхности клеток [63]. Соевые бобы характеризуются также высоким содержанием липидов (20–30%) и углеводов (26–30%), содержат витамин Е, витамины группы В, калий, цинк, железо, фосфор [64].

Соевые бобы содержат «антипитательные» факторы: ингибиторы протеолитических ферментов (трипсина и химотрипсина), гемагглютинины (лектины), уреазу и липоксигеназу. Данные компоненты термолабильны и могут быть инактивированы в результате тепловой обработки сои [63, 65]. Около 70% соевого белка составляют устойчивые к термообработке глобулины – глицинин и β -конглицинин, являющиеся запасными белками и используемые прорастающими семенами в качестве источника азота. Глицинин и β -конглицинин проявляют антигенные свойства, оказывая негативное действие на иммунную систему, и являются основными аллергенами сои [66]. В то же время, соевые белки являются источником биоактивных пептидов, обладающих поверхностно-активными, антиоксидантными свойствами, снижающих уровень холестерина, оказывающих гипотоническое действие и препятствующих тромбообразованию [64].

Сводные данные по химическому составу зернового и бобового сырья представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Средний химический состав зерна различных культур (на 100 г) [67, 68]

Культура	Вода, г	Жиры, г	Белки, г	Углеводы, г			Зола, г
				Крахмал	НКП	Сахара	
Зерновые							
Пшеница твердая	14,0	2,5	13,0	54,5	11,3	2,0	1,7
Пшеница мягкая	14,0	2,2	11,8	55,5	10,8	2,5	1,7
Рожь	14,0	2,2	9,9	54,0	16,4	1,5	1,7
Тритикале	14,0	2,1	12,8	общие углеводы = 72			1,7
Ячмень	14,0	2,4	10,3	54,6	14,5	1,3	2,4
Овес	13,5	6,2	10,0	53,7	12,0	1,1	3,2
Рис	14,0	2,6	7,5	61,4	9,7	0,9	3,9
Кукуруза	14,0	4,9	10,3	58,2	9,6	1,6	1,2
Бобовые							
Соя	12,0	17,3	34,9	11,6	13,5	5,7	5,0
Чечевица	14,0	1,5	24,0	43,4	11,5	2,9	2,7
Горох	14,0	2,0	20,5	44,9	11,2	4,6	2,8
Фасоль	14,0	2,0	21,0	43,8	12,4	3,2	3,6

1.2.2 Применение протеолитических ферментов при переработке растительного сырья

Хлебопекарное производство. Качество хлебобулочных изделий зависит от качества сырья, однако, около 70% муки, поступающей на хлебопекарные предприятия, имеют пониженные качественные показатели [69]. Для хлебопекарного производства наибольшее значение имеют протеазы, действующие в зоне рН 3,5–5,5, обладающие широкой субстратной специфичностью и, в то же время, способные осуществлять ограниченный протеолиз высокомолекулярных белковых субстратов для получения продуктов с заданными свойствами. Применение кислых грибных протеаз позволяет проводить ограниченную протеолитическую модификацию белков клейковины, что определяет свойства и вкус хлеба, обеспечивает стандартизацию процесса хлебопечения и сокращает технологический цикл [70, 71].

Высокое содержание водонерастворимых НКП в муке оказывает отрицательное воздействие на клейковину, что ухудшает структуру мякиша и отрицательно влияет на другие показатели качества хлеба. Поэтому

максимальный эффект от ферментативной обработки может быть достигнут при совместном использовании препаратов протеолитического и гемицеллюлолитического действия [72].

Спиртовое производство. Актуальной проблемой технологии производства спирта в настоящее время является низкая рентабельность спиртовых заводов, что неразрывно связано с проблемой эффективного использования зерна. Внесение кислых протеаз в сусло на стадии брожения позволяет эффективно гидролизовать белок и разрушать структурные связи в белково-липидных оболочках зернового сырья, что повышает эффективность действия глюкоамилазы, увеличивает степень конверсии углеводов, повышая конечный выход спирта. Кроме того, использование протеолитических ФП позволяет интенсифицировать процессы брожения за счет повышения концентрации растворимого азота, который является источником питания дрожжей [6, 73].

Виноделие и пивоварение. Одной из основных проблем при производстве белых вин является белковое помутнение. В белых винах с низким содержанием полифенолов при хранении происходит коагуляция и агрегация белков. Общее содержание белка в винах составляет от 15 до 230 мг/л и включает белок винограда, дрожжей и внесенных ФП пектиназ. Белки, вызывающие помутнение, переходят, в основном, из винограда. Они устойчивы к протеолизу большинством протеаз, благодаря компактной глобулярной структуре, затрудняющей доступ ферментов к пептидным связям. В промышленности белковое помутнение обычно устраняют очисткой на бентоните, адсорбирующем белки. Однако для различных белковых фракций нужны разные концентрации бентонита. Кроме того, бентонит неспецифичен и адсорбирует из вина и другие компоненты, удаляя некоторые соединения, формирующие вкус и аромат вина. В результате очистки на бентоните теряется около 20% объема вина. Применение кислых грибных протеаз, активных при низких значениях pH среды, позволяет снизить содержание белка на 50% без изменения органолептических свойств. Аспартатные протеазы

наиболее успешно используются в виноделии для снятия белковых помутнений [4, 74, 75].

Образование белковых помутнений, так же является серьезной проблемой в пивоварении. Образовавшиеся в процессе производства пива белки и полифенолы могут взаимодействовать между собой, образуя помутнения [4]. Поэтому кислые грибные протеазы также широко применяются в пивоварении, так как они обеспечивают устранение белкового помутнения, не влияя на пенообразование [4, 76].

Кормовая промышленность. Использование ФП в кормопроизводстве позволяет заменять дорогостоящие компоненты рационов более дешевыми зерновыми культурами с высоким содержанием трудногидролизуемых веществ, такими как рожь, пшеница, ячмень и др., повышает продуктивность животных, способствует улучшению их физиологического состояния, сохранности поголовья, облегчает соблюдение санитарно-гигиенических норм их содержания [8, 77, 78]. Применение ФП наиболее актуально для моногастричных животных (свиней и птиц) из-за отсутствия в их организме ферментов, расщепляющих полимерные вещества клеточных стенок злаковых культур [79]. ФП используют также для повышения питательной ценности кормов для некоторых жвачных животных: телят, лактирующих коров [37, 80]. Особую роль играют ФП в рационах для молодых животных, у которых недостаточно развита система пищеварительных ферментов и еще не сформировалась микрофлора кишечника [81].

Внесение протеаз обеспечивает нормализацию микрофлоры желудочно-кишечного тракта за счет снижения количества непереваренного белка, попадающего в кишечник, способствующего пролиферации патогенных микроорганизмов [37, 77, 82]. В растительном сырье белок находится в связанном состоянии с гемицеллюлозой (представленной преимущественно ксиланами) и крахмалом, поэтому при совместном действии гемицеллюлаз и протеаз наблюдается синергетический эффект: интенсивно высвобождаются продукты гидролиза белка, крахмала и НКП [81, 82]. Максимальный эффект достигается

при совместном внесении в корма на основе злаковых культур ФП ксиланаз и протеаз [37].

Внесение протеаз при производстве кормов на основе целлюлозосодержащих отходов (барды, соевой шелухи, пшеничной соломы и др.) с использованием ферментов целлюлолитического и гемицеллюлолитического комплекса позволяет увеличить содержание усвояемых углеводов за счет гидролиза белков растительных клеточных стенок [83].

Грибные протеазы, благодаря уникальной специфичности действия, обеспечивающей получение продуктов с заданными свойствами, нашли широкое применение в пищевой и кормовой промышленности. Ниже представлены некоторые коммерческие протеолитические ФП на основе грибных продуцентов (таблица 3).

Таблица 3 – Коммерческие ферментные препараты грибных протеаз и область их применения [10]

ФП	Продуцент	pH-оптимум	Температурный оптимум, °C	Область применения
Amano Enzyme Inc. (Япония)				
Protease P «Amano» 6SD	<i>A. melleus</i>	7,0–8,0	40–45	Продукты питания, ароматизаторы, фармацевтика
Acid protease A	<i>Aspergillus sp.</i>	3,0	55	Продукты питания
Protease A «Amano» 2SD	<i>A. oryzae</i>	7,0	50	Продукты питания, фармацевтика
Protease M «Amano» SD	<i>A. oryzae</i>	4,5	50	Продукты питания
Biocatalysts Ltd (Великобритания)				
Promod 192P	<i>A. oryzae</i>	4,0–6,0	40–55	Продукты питания, вкусовые добавки
Promod 215MDP	<i>Aspergillus sp</i>	5,5–6,5	45–50	Продукты питания, вкусовые добавки
Flavorpro 750MDP	<i>Aspergillus sp</i>	5,5–7,5	45–50	Продукты питания
Promod 845MDP	<i>Aspergillus sp</i>	5,5–7,5	45–55	Производство сыров
Promod 782MDP	<i>Aspergillus sp</i>	6,0–9,0	40–60	Вкусовые добавки
Flavorpro Umami	<i>Aspergillus sp</i>	5,5–7,5	45–55	Вкусовые добавки
Flavorpro 937MDP	<i>A. oryzae</i>	5,0–7,0	45–55	Производство сыров
Enzyme Development corporation (США)				
Enzeco Fungal Protease 180	<i>A. oryzae</i>	6,0–10,5	45–60	Продукты питания
Enzeco Fungal Protease Conc.	<i>A. oryzae</i>	5,0–6,0	45–55	Продукты питания

ФП	Продуцент	pH-оптимум	Температурный оптимум, °C	Область применения
Enzeco Fungal Acid Protease	<i>A. niger</i>	2,5–3,0	40–55	Продукты питания
Novozymes corp. (Дания)				
Flavourzyme	<i>A. oryzae</i>	5,0–7,0	45–50	Продукты питания
AB Enzymes (Германия)				
Veron PS	<i>A. oryzae</i>	5,0–6,0	45–50	Продукты питания, хлебопечение
Shin Nihon Chemical Co. (Япония)				
Sumizyme AP	<i>A. niger</i>	3,0	60	Продукты питания
Sumizyme RP	<i>R. delemar</i>	4,0	55	Продукты питания
Sumizyme LP	<i>A. oryzae</i>	7,0–11,0	50	Продукты питания
Sumizyme LPL	<i>A. oryzae</i>	3,0	50	Продукты питания
Sumizyme FP	<i>A. sojae</i>	6,0–10,0	50	Продукты питания
Sumizyme MP	<i>A. melleus</i>	8,0	50	Продукты питания
Solvay (Бельгия)				
Fungal protease	<i>A. oryzae</i>	4,9–9,0	45–55	Производство спирта, выпечка, кормопроизводство
SternEnzym GmbH (Германия)				
Sternzyme B2000	Грибная протеаза	4,0–6,0	45–55	Выпечка
Sternzyme B2010	Грибная протеаза	4,0–6,0	45–55	Специализированная выпечка
Sternzyme B2050	Грибная протеаза	4,0–6,0	45–55	Бисквиты и крекеры
Yakult Biochemical Co. (Япония)				
Pancidase NP-2	<i>A. oryzae</i>	-	-	Продукты питания
Protease YP-SS	<i>A. niger</i>	-	-	Продукты питания

1.3 Грибные продуценты протеаз

Мицелиальные грибы отличаются способностью продуцировать широкий спектр ферментов с различной субстратной специфичностью и физико-химическими свойствами [82, 84]. Протеазы составляют одну из основных групп ферментов, секретируемых мицелиальными грибами. Грибы продуцируют кислые, нейтральные и щелочные протеазы. Благодаря отработанным схемам культивирования и отделения синтезированного продукта от мицелиальной биомассы, промышленные грибные штаммы являются перспективными культурами для производства протеолитических ферментов [82]. Одним из первых представителей грибных протеаз была протеиназа К, щелочной фермент

из *Engyodontium album*, также известного как *Tritirachium album*. Протеазы активно продуцируют грибы, принадлежащие родам *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Humicola*, *Mucor*, *Thermomyces*, *Trichoderma* и др. [10, 71, 85]. *A. oryzae* является доминирующим источником грибных протеаз [4, 86].

Протеолитические ферменты мицелиальных грибов различаются по физико-химическим и каталитическим свойствам, что определяет аспекты применения препаратов протеаз. Кислые протеазы наиболее активны при pH 4,0–4,5, нейтральные – при pH 7,0, щелочные – при pH 7,0–11,0 [74].

Кислые протеазы мицелиальных грибов представлены, главным образом, пепсин-подобными аспартатными протеазами [86]. Их молекулярный вес варьирует между 35 и 50 кДа. Они проявляют максимальную активность при pH 3,0–4,0. Грибные штаммы синтезируют несколько видов аспартатных протеаз [87].

Грибы рода *Aspergillus* продуцируют аспергиллопепсин I и аспергиллопепсин II, различающиеся по субстратной специфичности. Аспергиллопепсин I (ЕС 3.4.23.18) не обладает молокосвертывающей активностью, гидролизует различные белковые субстраты, широко применяется для получения белковых гидролизатов без горечи, вкусовых компонентов на основе белка, для модификации вкуса в молочном производстве, для обработки муки в хлебопечении. Этот фермент также называют аспергиллопепсин А (продуцент *A. awamori*), аспергиллопепсин F (*A. foetidus*), протеиназа В, проктаза В (*A. niger*), аспергиллопептидаза А (*A. saitoi*). Аспергиллопепсин II (ЕС 3.4.23.18) не обладает молокосвертывающей активностью, гидролизует β -цепь инсулина. Из-за узкой специфичности не применяется в промышленности. Фермент также называют проктаза А или протеиназа А (продуцент *A. niger* var. *macrosporus*).

Пенициллопепсин (ПЕП, ЕС 3.4.23.20), синтезируемый грибами рода *Penicillium*, обладает широкой субстратной специфичностью, по специфичности действия аналогичен аспергиллопепсину I, предпочтительно катализировать гидролиз гидрофобных остатков в положении P1 и P1', кроме того расщепляет

связи Gly-Gly в β -цепи инсулина. ПЕП широко применяется для получения пептидов, не образующих горечь [87, 88].

Известны также ризопусепсин (из *Rhizopus sp.*) и мукорпепсин (из *M. pusillus*, *M. miehei*). Ферменты обладают молокосвертывающей активностью. Ризопусепсин характеризуется широкой специфичностью действия, как и ПЕП; мукорпепсин по специфичности близок к ренину. Однако использование данных ферментов в промышленности ограничено требованиями безопасности [87].

Щелочные сериновые протеазы широко распространены в природе и присутствуют во всех формах клеточной жизни. Сериновые протеазы продуцируют бактерии, включая *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Flavobacterium*, мицелиальные грибы, включая *Conidiobolus*, *Aspergillus*, *Neurospora*, дрожжи, в том числе *S. cerevisiae* [89].

Сериновые протеазы продуцируют грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Paecylomices*, *Trichoderma*, *Cephalosporium* и др. [9]. Хорошо изучены и широко применяются сериновые протеазы мицелиальных грибов рода *Aspergillus*: *A. niger*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*, *A. clavatus* [90, 91]. Щелочные протеазы аспергиллов проявляют высокую степень гомологии субтилизинам (29–44%). Наиболее подробно исследован оризин из *A. oryzae* (*Alp*), проведены работы по определению его а.к. последовательности и клонированию гена. Протеазу *Alp* экспрессировали в дрожжах *S. cerevisiae* и *Zygosaccharomyces rouxii*, однако, продуктивность рекомбинантных штаммов была ниже коммерчески приемлемого уровня. Сериновую протеазу *A. oryzae* также клонировали в метилотрофные дрожжи *P. pastoris* [92]. Были проведены исследования по клонированию термостабильной щелочной протеазы *B. stearothermophilus* и *P. pastoris* [93]. Известен штамм *A. oryzae* U1521, содержащий несколько копий гена щелочной протеазы *Alp* [94].

Среди нейтральных эндопептидаз мицелиальных грибов наиболее часто встречается цинк-зависимая нейтральная металлопротеиназа [70].

Среди грибных экзопептидаз наиболее распространена ЛАП. Коммерческие препараты ЛАП, получают из *R. oryzae*, *A. sojae* и *A. oryzae* [23, 95]. Очищенный

фермент из *A. sojae* (ATCC 42249) наиболее активен при pH 9,0 и 70°C [95]. Супернатант КЖ *A. oryzae* шт. ATCC 20386 содержит ЛАП, активную при pH 9,5 и 55°C [96].

Ниже приведены свойства некоторых грибных протеаз (таблица 4).

Таблица 4 – Свойства некоторых грибных протеаз [10]

Продуцент	Фермент	Mw, кДа	Оптимум pH	Оптимум T, °C	Литература
<i>A. clavatus</i> ES1	Щелочная сериновая протеаза	32	8,5	50	[97]
<i>A. clavatus</i> CCT2759	Щелочная протеаза	-	9,5	40	[38]
<i>A. fumigatus</i> Fresenius TKU003	Щелочная сериновая протеаза	124	8,0	40	[98]
<i>A. oryzae</i> ATCC 20386	ЛАП	56	9,5	55	[96]
<i>A. sojae</i> ATCC 42249	ЛАП	41	9,0	70	[95]
<i>A. sydowi</i>	Щелочная сериновая протеаза	40	7,0–7,5	45	[99]
<i>A. tamaraii</i>	Щелочная протеаза	48	7,5–8,0	45–50	[100]
<i>A. terreus</i>	Щелочная сериновая протеаза	37	8,5	37	[101]
<i>Beauveria bassiana</i>	Щелочная сериновая протеаза	35	8.5	37	[102]
<i>Chrysosporium keratinophilum</i> IMI 338142	Кератиназа	-	8,0	40	[103]
<i>Conidiobolus coronatus</i> NCIM 1238	Щелочная сериновая протеазы В	6,8	9,7	45	[104]
<i>Fusarium culmorum</i>	Сериновая субтилизин-подобная протеаза	28,7	8,3–9,6	50	[105]
<i>Humicola lanuginosa</i> (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	Сериновая тиолзависимая протеаза	38	8,0	-	[106]
<i>N. crassa</i>	Кислая протеаза	66	БСА – 4,0	-	[107]
	Металлопротеаза М-2	18	БСА – 4,5	-	

Продуцент	Фермент	Mw, кДа	Оптимум pH	Оптимум T, °C	Литература
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Сериновая тиолзависимая протеаза	33,5	10,0–12,0	30–60	[108]
<i>P. duponti</i> <i>K1014</i>	Кислая протеаза	41	Казеин – 2,5 Гемоглобин – 3,0	-	[109]
<i>P. expansum</i>	Щелочная цистеиновая протеаза	20,5	10,5	35	[110]
<i>R. oryzae</i>	Кислая аспартатная протеаза	34	5,5	60	[111]
<i>Scedosporium apiospermum</i>	Щелочная сериновая протеаза А	33	9,0	37–50	[112]
<i>Scytalidium thermophilum</i>	Сериновая тиолзависимая протеаза и сериновая протеаза	-	6,5–8,0	37–45	[113]
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Кислая протеаза	-	5,5	60	[114]

1.4 Подходы к получению грибных рекомбинантных продуцентов

1.4.1 Использование мицелиальных грибов для продукции рекомбинантных белков

Получение высокоактивных рекомбинантных штаммов с применением методов генной инженерии является одним из основных направлений современной биотехнологии. Преимущество генной инженерии по сравнению с методами классической микробиологии состоит в (1) возможности получения мультиферментных комплексов с заданным соотношением компонентов, (2) меньших затратах времени для создания новых штаммов, (3) возможности получения продуцентов целевых коммерчески важных ферментов и (4) стабильной интеграции целевого гена(ов) в хромосому гриба [115].

В настоящее время значительную долю коммерческих ФП и других продуктов промышленной биотехнологии производят с использованием

рекомбинантных штаммов мицелиальных грибов. Экспрессионные системы на основе грибов характеризуются более высоким уровнем секреции ферментов по сравнению с бактериальными. Ранее широкому применению мицелиальных грибов для продукции гетерологичных белков препятствовала сложность и недостаточное понимание их физиологии по сравнению с бактериальными штаммами [115]. Однако в последние десятилетия был получен большой объем информации о геноме грибных штаммов, что позволяет разрабатывать эффективные системы экспрессии для создания промышленных рекомбинантных штаммов. Был получен ряд грибных штаммов-реципиентов и разработаны методы их трансформации для повышения уровня синтеза целевых ферментов. Наиболее часто используют системы экспрессии на основе штаммов *Aspergillus* [116, 117] и *Trichoderma* [118, 119]. Также известно использование штаммов *Neurospora crassa* для экспрессии гетерологичных генов с целью производства вакцин на основе белков и ферментов, и *Myceliophthora thermophila* (ранее *Chrysosporium lucknowense*) в качестве реципиента для экспрессии ферментов [115, 120].

При создании трансформационных систем основные требования к штамму-реципиенту заключаются в следующем:

- простой, масштабируемый процесс культивирования с использованием недорогих ферментационных сред;
- способность секретировать большое количество внеклеточного белка (не менее 10-15 г/л белка);
- способность к продуктивной секреции (экспрессии) целевого белка, т.е. к продукции белка в активной форме, без дополнительных этапов активации или модификации;
- простота экспериментального подхода трансформации, высокая частота трансформации;
- стабильность получаемых трансформантов (интегративная встройка экзогенной ДНК);

- широкий диапазон используемых для экспрессии регуляторных элементов, простых и универсальных в применении;
- возможность использования дешевых селективных маркеров.

Общая схема получения ФП с использованием трансформационных систем на основе мицелиальных грибов, применяемая в области генной инженерии, представлена на рисунке 5 (по данным [11]).

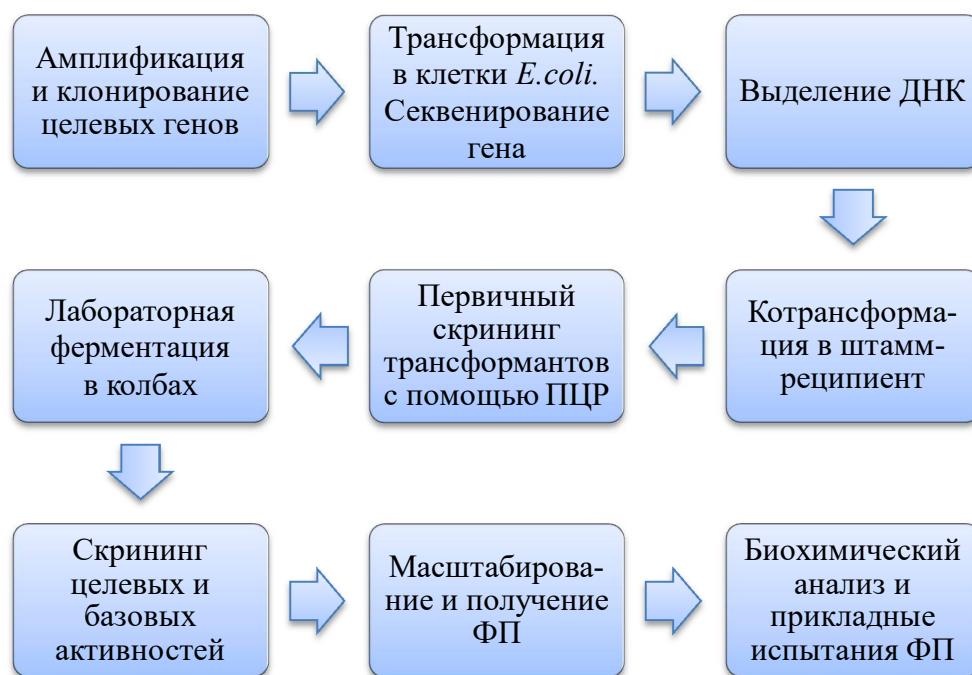


Рисунок 5 – Схема получения ферментных препаратов с использованием мицелиальных грибов в качестве реципиента

Первый этап заключается в амплификации и клонировании целевого гена в соответствующие экспрессионные векторы. Полученную экспрессионную плазмиду трансформируют в клетки *E. coli* для определения последовательности клонированного гена (чтобы исключить делеции, мутации и инсерции). Затем, осуществляют накопление и выделение достаточного для трансформации количества ДНК (около 10 мкг). После этого экспрессионную плазмиду, вместе с плазмидой, содержащей селективный маркер, трансформируют в грибные протопласты. Следующим шагом является первичный скрининг грибных рекомбинантных клонов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для

определения хромосомной интеграции целевых генов. Далее проводят ферментацию полученных трансформантов в качалочных колбах с целью определения уровня биосинтеза базовых и целевых активностей. Последний этап – культивирование полученных рекомбинантных штаммов в ферментерах с получением опытных образцов ФП для проведения прикладных испытаний [11].

1.4.2 Создание экспрессионной системы на основе штамма *P. canescens*

Несмотря на наличие перспективных грибных штаммов-реципиентов рода *Aspergillus* и *Trichoderma*, поиск эффективной экспрессионной системы на основе новых грибных штаммов является весьма актуальной задачей.

В начале 1980-х годов проводились исследования по выделению грибных почвенных изолятов и изучению их способности синтезировать новые гемицеллюлазы. В результате скрининга был выделен грибной штамм, продуцирующий эндо-1,4-β-ксиланазу (КсилА), β-галактозидазу (БГАЛ) и арабиноксилан-фураногидролаза А (АБФА). Штамм способен расти в широком диапазоне pH (4,5–6,0) и температуры (25–35°C). На основании морфологических характеристик изолят был классифицирован как *P. canescens* и депонирован во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов (ВКМ) РАН наук под номером ВКМ F-178. Во ВНИИГенетика и ФИЦ Биотехнологии РАН на основе выделенного штамма *P. canescens* была создана платформа для получения рекомбинантных штаммов-продуцентов мультиэнзимных комплексов [11].

1.4.2.1 Выбор селективного маркера для штамма *P. canescens*

Для штамма *P. canescens* F-178 был разработан селективный маркер, основанный на комплементации *niaD*⁻ мутантов, лишенных активности по нитратредуктазе, с использованием гомологичного структурного гена нитратредуктазы (*niaD*). Известно, что фермент нитратредуктаза способствует утилизации нитрата в качестве единственного источника азота и, возможно,

одновременно контролирует транспорт аминокислот в клетку. Системы генетической трансформации с геном *niaD* широко используют в грибах рода *Aspergillus* и родственных им мицелиальных грибах, так как они дают возможность применять прямую селекцию для мутантного и дикого фенотипов. И хотя генетические и биохимические основы этой системы были разработаны для *A. nidulans*, экспериментальные методы были легко адаптированы для *P. canescens* F178 и его производных [121]. Применяют стандартный метод котрансформации, при котором смесь трансформационных векторов и гомологичных ауксотрофных селективных маркеров используются в соотношении (мкг ДНК) 10:1. Эффективность трансформации, как правило, составляет сотни трансформантов на мкг трансформирующей ДНК, с частотой котрансформации 80% и выше [11].

Для создания трансформационной системы, на основе штамма *P. canescens* F178 был получен реципиентный штамм *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻ [11] согласно схеме, приведенной на рисунке 6.

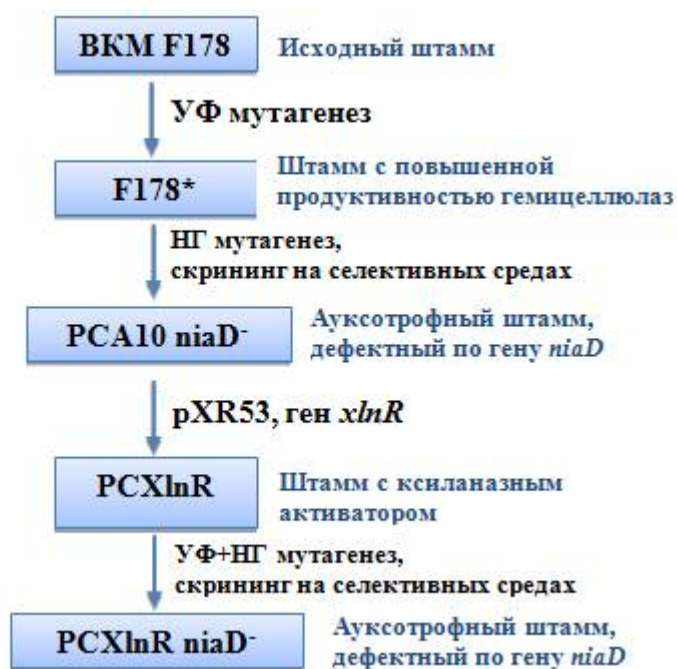


Рисунок 6 – Схема получения штамма *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻

На первом этапе был проведен мутагенез штамма F-178 с использованием ультрафиолетового облучения (УФ) с целью увеличения его продуктивности. Далее, в результате обработки нитрозогуанидином (НГ), на основе *P. canescens F178** был получен ауксотрофный штамм *PCA-10 niaD⁻*, дефектный по гену нитратредуктазы. Оба штамма – *P. canescens F178** и его *niaD⁻* мутант, проявляли повышенную способность к синтезу ферментов БГАЛ (70–80 ед./см³) и Ксила (100 ед./см³) [122].

Была исследована индукция биосинтеза секретируемых ферментов БГАЛ и Ксила в исходном штамме *P. canescens F178* и мутантном штамме *P. canescens PCA10 niaD⁻*. Биосинтез обоих ферментов индуцировался, в основном, арабинозой и арабитом, продуктом катаболизма арабинозы. Однако, индукция синтеза ферментов происходила по-разному: максимальный уровень БГАЛ был достигнут при концентрации арабинозы 1 мМ, а Ксила – 10 мМ. Кроме того, было показано, что экспрессия Ксила может быть инициирована 1 мМ ксилозы [123]. Индуктор взаимодействует с активатором транскрипции, транскрипционные активаторы ксиланазы являются важными регуляторными белками для старта механизма транскрипции у грибов рода *Aspergillus* [124] и *Trichoderma* [125]. Поэтому гомологичный ген транскрипционного активатора ксиланазы *P. canescens (xlnR)* был клонирован и секвенирован; была получена плазмида pXR53 и трансформирована в штамм *P. canescens PCA10 niaD⁻*. В результате был создан штамм *P. canescens PCXlnR*, продуцирующий высокий уровень ксиланазы на средах, содержащих свекловичный жом и соевую или овсяную шелуху. Этот рекомбинантный штамм стал платформой для получения нового ауксотрофного штамма *P. canescens PCXlnR niaD⁻* (рабочее название – *RN3-11-7 niaD⁻*), который был использован в качестве реципиента для получения ряда рекомбинантных штаммов и ФП [11].

1.4.2.2 Идентификация и выделение сильных промоторов для экспрессии генов

Так называемые сильные промоторы, как правило, обеспечивают высокий уровень экспрессии целевого гена, что приводит к биосинтезу высокого уровня соответствующего генного продукта.

В связи с этим, были проведены исследования по идентификации промоторов основных ферментов, синтезируемых штаммом *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻. Основные внеклеточные белки, секретируемые штаммом *P. canescens* – БГАЛ (120 кДа), КсилА (30 кДа) и АБФА (70 кДа), составляют приблизительно 10, 20 и 25% от секретируемого ферментативного комплекса, соответственно [122, 126].

Анализ нуклеотидной последовательности гена БГАЛ (*bgas*) и его промоторной области показал наличие нескольких потенциальных CREА-связывающих сайтов, ответственных за катаболитную репрессию. Были получены трансформанты с увеличенным числом копий гена *bgas* и установлено, что β-галактозидазная активность трансформантов возрастает линейно с увеличением числа копий гена, пока не достигнет 12 копий на геном [121].

Был клонирован и секвенирован полный ген *xylA*, кодирующий КсилА. В промоторной области были обнаружены нуклеотидные последовательности для связывания белка CREА, а также транскрипционного активатора *xlnR*. Был создан ряд рекомбинантных штаммов *P. canescens*, показывающих 7-8-кратное увеличение ксиланазной активности. Доля КсилА для наиболее продуктивных штаммов составила 30-50% от общего пула секретируемого белка [127].

Был клонирован и секвенирован полный ген *abfA*, кодирующий АБФА. Анализ нуклеотидной последовательности показал отсутствие каких-либо сайтов связывания для CREА белка. Однако, уровень продукции АБФА в ферментационной среде штамма *P. canescens* ниже, чем уровень секреции КсилА и БГАЛ при тех же условиях ферментации. Несмотря на это, экспрессия целевых генов, основанная на *abfA* промоторе, может быть использована в том случае,

когда нужно добавить минорные фермент(ы) к секретируемому рекомбинантному мультиферментному комплексу [128].

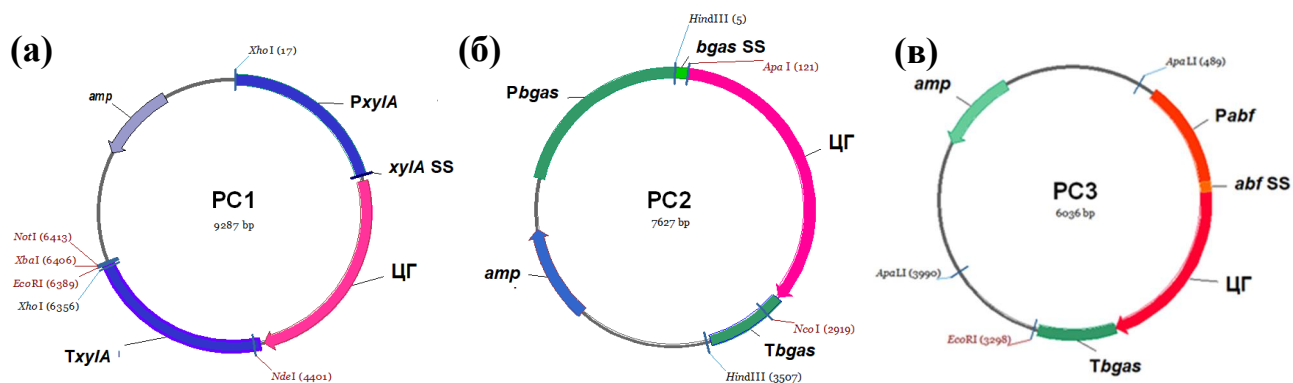


Рисунок 7 – Схематическое изображение мультикопийных векторов экспрессии:

(а) PC1, где *PxylA*-промоторная область гена *xylA*; *TxylA* – терминаторная область гена *xylA*; (б) PC2, где *Pbgas*-промоторная область гена *bgas*; *Tbgas* – терминаторная область гена *bgas*; (в) PC3, где *Pabf*-промоторная область гена *abfA*; *Tbga* – терминаторная область гена *bgas*; *amp* – ген устойчивости к ампициллину, ЦГ – целевой ген.

Таким образом, созданная универсальная система экспрессии позволяет использовать *P. canescens* в качестве реципиента для создания новых перспективных рекомбинантных штаммов и перспективных ФП, востребованных различными секторами промышленности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из литературных источников очевидна актуальность применения комплексных препаратов грибных протеаз эндо- и экзодействия в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства. На российском рынке ФП, в связи с отсутствием высокоактивных отечественных продуцентов, представлены, в основном, коммерческие препараты грибных протеаз зарубежных фирм. Поэтому представляется необходимым создание высокоактивных продуцентов грибных протеаз, перспективных для получения на их основе конкурентоспособных комплексных ФП, содержащих основные грибные протеазы, в частности, кислую аспартатную протеазу, лейцинаминопептидазу и сериновую протеазу.

Проведенный анализ литературных данных показал перспективность штамма *P. canescens* как продуцента для производства промышленно-значимых ферментов, благодаря высокой скорости роста и развитой системе биосинтеза внеклеточных ферментов, способности утилизировать недорогие ферментационные среды и легкости масштабирования ферментационного процесса. Созданная в ФИЦ «Биотехнологии» РАН универсальная система экспрессии позволяет использовать *P. canescens* в качестве реципиента для создания новых перспективных рекомбинантных штаммов и перспективных ФП, востребованных различными секторами промышленности.

Целью наших исследований, как уже отмечалось выше, являлось создание с использованием методов селекции и генетической инженерии на основе штамма *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻ высокоактивных продуцентов комплекса протеаз с широкой специфичностью действия, получение на основе новых рекомбинантных штаммов ФП, изучение их состава и свойств и использование полученных ФП для повышения эффективности биотехнологических процессов.

2 ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Исследования проводили в лабораторных условиях ВНИИПБТ (филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»), «ФИЦ Биотехнологии РАН» (ИНБИ им. А.Н. Баха РАН), кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова; в лабораторных и опытно-промышленных условиях ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН (подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пущино); в производственных условиях завода ООО «Агрофермент» (Тамбовская обл., с. Старосеславино); испытания *in vivo* проводили в условиях племзавода «Орловский» (Тамбовская область).

2.1 Штаммы-микроорганизмы

В качестве реципиентного штамма использовали предоставленный ИНБИ им. А.Н. Баха РАН штамм *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻, дефектный по гену *niaD*, кодирующему нитратредуктазу. Данный штамм является продуцентом комплекса карбогидраз (Ксил, α-L-арабинофуранозидазу, АБФА и α-галактозидазу А и С, БГАЛ) [126, 129].

Для субклонирования целевых генов, а также для препаративного получения ДНК использовали штамм *E. coli* MachI (ΔrecA1398 endA1 tonA Φ80ΔlacM15 ΔlacX74 hsdR(rm)) фирмы «Invitrogen» (США).

Штаммы, полученные в ходе работы: *P. canescens* *Perp-4* – продуцент кислой протеазы и ксиланазы; *P. canescens* RN3-11-7-7 – продуцент кислой протеазы, ЛАП и ксиланаза; *P. canescens* *Oryzin-25* – продуцент щелочной сериновой протеазы и ксиланаза.

Для проведения бродильных проб использовали дрожжи *S. cerevisiae* 985T.

2.2 Используемые плазмидные конструкции

Экспрессионные плазмидные конструкции: 1) pPrXEG_PEP, несущая целевой ген пенициллопепсина (*pepA*) из *P. canescens* под ксиланазным промотором гриба *P. canescens*, 2) pPrAbf_Lap1, в составе которой ген ЛАП (*lapI*) из *A. oryzae* находится под арабинофуранозидазным промотором, и 3) pPrXEG_alcPr_Aor, несущей ген сериновой протеазы *A. oryzae* (*alp*) под ксиланазным промотором были получены в лаборатории Биотехнологии ферментов ИНБИ им. А.Н. Баха РАН (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Для получения достаточного количества ДНК материала с целью трансформации реципиентного штамма, плазмидная ДНК была трансформирована в компетентные клетки штамма бактерии *E. coli* MachI («Invitrogen», США), полученные трансформанты были прокультивированы на стандартной среде Lauria-Bertrani («Sigma», США) и, далее, необходимое количество плазмидной ДНК было выделено согласно стандартной методике фирмы «Qiagen» (США).

2.3 Получение плазмидных конструкций

Полинуклеотидные последовательности, соответствующие полноразмерному гену *pepA* из штамма *P. canescens*, гену *lapI* из штамма *A. oryzae* и гену *alp* из штамма *A. oryzae* были амплифицированы методом ПЦР, где в качестве матрицы использовали геномные ДНК *A. oryzae* и *P. canescens*, соответственно, выделенные с помощью набора фирмы «Qiagen» (США) по стандартным протоколам. Для амплификации последовательности использовали праймеры:

perA-UpLIC	CAAACAGAAGCAACCGACACAATGGTTGTCTTCAGCCAGATCAGG
perA-LowLIC	AGAGCAAGCCGAGCAGGTTAGGCCTGGGGAGCGAAGCCAAGA
Abf_Lap-UP	GCAAAGCAGAAAAATGCGTTTCCTCCCCTGCATCGCGACTTTGGCA
Abf_Lap-LOW	AGAGCAAGCCGAGCAGGTTTACAGCGAATCTGCGAAGGCAAGCTCATATG
AlcPr_Aor-LowLIC	AGAGCAAGCCGAGCAGGTTAAGCGTTACCGTTGTAGGCAAGCAGGTTAG
AlcPr_Aor-UpLIC	GCACAGGCAGCAGGAGCTGCCCCTGTGCAGGAAACCCGCCGGGCCGCTG

ПЦР проводили на приборе MyCycler («BioRad», США) по следующему протоколу: 95°C – 4 мин – 1 цикл; 95°C – 1 мин 30 сек, 50°C – 1 мин, 68°C – 2 мин – 25 циклов; 68°C – 10 мин, 4°C – 30 мин. Полученные ПЦР-продукты были клонированы в вектор pXEG, pAbfA и pXEG_{universal}, соответственно, с использованием метода независимого лигирования. Для этого они были выделены из агарозного геля и очищены с использованием набора реагентов фирмы «Qiagen» (США). Далее ПЦР-продукты были обработаны Т4-ДНК-полимеразой («Fermentas», США) в присутствии dATP (как необходимого нуклеотида, подходящего для прерывания 3'-5' экзонуклеазной активности полимеразы). Затем обработанные вставки были лигированы в pXEG, pAbfA и pXEG_{universal} векторы, соответственно, путем смешивания 50 нг вектора и 150 нг вставки. Смесь инкубировали при 22°C в течение 30 мин, после чего трансформировали в клетки *E. coli* MachI в присутствии ампициллина (100 мкг/см³) по стандартному протоколу трансформации, описанному в стандартных лабораторных протоколах.

Далее, полученные бактериальные колонии были скринированы методом ПЦР. Бактериальный материал был использован в качестве матрицы для ПЦР, в качестве праймеров для скрининга использовались олигонуклеотиды для клонирования соответствующих генов и праймеры, комплементарные промоторной области вставки. Положительные колонии были использованы для выделения плазмидной ДНК, которая была секвенирована по методу Сэнгера.

Нуклеотидные последовательности соответствующих генов не содержали мутаций, инсерций или делеций.

Ниже приведены схематические карты плазмид pPrXEG-PEP (рисунок 8а), pPrABF-LAP (рисунок 8б) и pPrXEG_alcPr_Aor (рисунок 8в).

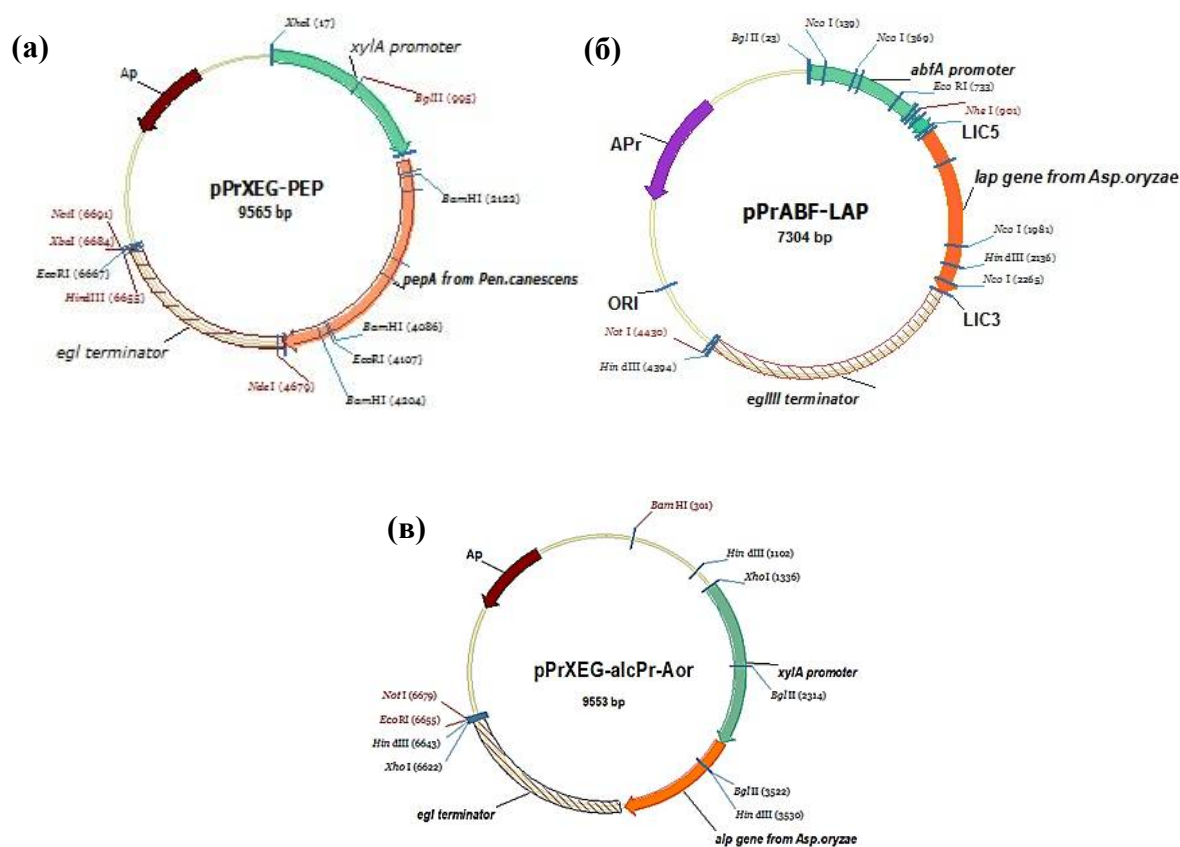


Рисунок 8 – Схематичное изображение плазмид pPrXEG-PEP(а), pPrABF-LAP(б) и pPrXEG_alcPr_Aor (в)

2.4 Получение протопластов и трансформация реципиентного штамма

2.4.1 Получение компетентных клеток реципиентного штамма *P. canescens*

RN3-11-7 niaD⁻

Штамм *P. canescens* *RN3-11-7 niaD⁻* выращивали на жидкой среде РМ с 10мМ NH_4Cl и 1% глюкозы при 30°C и 200–250 об/мин в течение 12–14 ч. Полученный мицелий фильтровали и ресуспендировали в буфере FBP (1,2М

MgSO₄, 10мМ NaH₂PO₄, pH 5,8). Вносили лизирующий фермент – Lysing Enzymes из *T. harzianum* (SIGMA:L1412) в концентрации 15 мг/см³ и БСА в концентрации 2,5 мг/см³ и инкубировали при 30°C в течение 2–3 ч в термостатируемом шейкере (200–500 об/мин).

Наслаивали равный объем буфера ST (0,6М сорбитол, 0,01М трис-HCl pH 7,0). Центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15–20 мин при температуре 8–10°C. Отбирали слой протопластов, который образуется на границе раздела растворов и переносили его в стерильную пробирку объемом 2 см³, промывали два раза в буфере ST, и ресуспендировали протопласты в 2 см³ буфера SCT (1,2М сорбитол, 0,01М трис-HCl, 0,01М CaCl₂, pH 7,5).

Количество полученных протопластов определяли при помощи камеры Горяева по формуле:

$$\text{количество протопластов в } 1 \text{ см}^3 = X \times 4 \times 10^6,$$

где X – количество протопластов в маленькой клетке камеры Горяева.

2.4.2 Трансформация

На одну трансформационную точку использовали 3×10^7 протопластов, растворенных в 0,2 см³ буфера SCT, 10 и 1 мкг целевой и котрансформационной ДНК, соответственно, и 0,05 см³ буфера PCT (50% ПЭГ-4000, 0,01М трис-HCl, 0,01М CaCl₂, pH 7,5).

Смесь инкубировали во льду в течение 20 мин. Затем добавляли к ней 0,5 см³ буфера PCT, инкубировали 5 мин при комнатной температуре и перерастворяли в 0,2 см³ 1,2М сорбитола.

2.4.3 Рассев протопластов на агаризованные среды

Для посева использовали чашки Петри с нижним агаром и пробирки с верхним агаром. В состав верхнего агара входили агар-агар (0,7%), 1,2М сорбитол, глюкоза (0,8%) и источник азота, нитрат натрия (селективная среда)

или хлорид аммония (неселективная среда). Состав нижнего агара отличался только концентрацией агара – 2%. Пробирки с верхним агаром перед посевом помещали в кипящую водяную баню, чтобы расплавить агар, а затем в водяной термостат при температуре 48°C, чтобы остудить его.

Трансформационную смесь добавляли в пробирки с расплавленным и остывшим до 48°C верхним агаром, содержимое пробирки перемешивали и выливали на чашку Петри с нижним агаром. Трансформанты высевали на селективную среду, в качестве контролей делали посев протопластов без ДНК на селективную и неселективную среду.

Чашки с трансформантами и контролями инкубировали в течение 5 суток при температуре 30°C.

2.5 Среда для культивирования штаммов

Биомассу исходного штамма-реципиента для трансформации получали с использованием минимальной среды РМ, содержащей (% масс.): KH_2PO_4 – 0,15, KCl – 0,05, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05, H_3BO_3 – 0,00025, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,002, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,004, $\text{MnSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,004, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,004, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,004, глюкозу – 1,0, NH_4Cl – 10мМ. Трансформанты высевали на агаризованную минимальную среду (2,0 % масс), в которой NH_4Cl (10мМ) был заменен на NaNO_3 (10мМ). Споровый посевной материал штаммов получали и хранили на среде SM следующего состава (% масс.): глюкоза – 1,0, KH_2PO_4 – 1,0, дрожжевой экстракт – 0,5, агар-агар – 2,0, штамм выращивали не менее 7 суток при 30°C.

Для глубинного культивирования штаммов использовали ферментационную среду следующего состава (% масс.): соевая шелуха – 4,5, кукурузный экстракт – 5,0, KH_2PO_4 – 2,5. Культивирование продуцентов осуществляли в колбах объемом 750 см³ в 100 см³ ферментационной среды на качалке (240 об/мин) при 30°C в течение 144 ч. КЖ отделяли от мицелия центрифугированием в течение 10 мин при 10750 g.

Для приготовления засевных дрожжей использовали солодовое сусло плотностью 12°Б. Выращивание засевных дрожжей проводили при 30°С в течение 24 ч.

2.6 Ферментные препараты

В качестве сравнения в работе использовались коммерческие ФП: Protoferm FP (Shandong Longda Bio-Products Co., Ltd., Китай), Палпфор 2 (ООО «Микробиопром», Россия), Acid Protease (Beijing Challenge Bio-technology Limited company, Китай).

2.7 Субстраты

Для определения ферментативных активностей использовали следующие субстраты: гемоглобин, казеинат натрия, ксилан из древесины березы, β -глюкан ячменя, L-лейцин-пара(4)-нитроанилид («Sigma», США).

Для проведения прикладных испытаний ФП использовали пшеничную, соевую и ржаную муку (ООО «Гарнец», Россия), тритикале (ФГБНУ ДЗНИИСХ РАН, Россия), после спиртовую сухую барду (ОАО «Уржумский Спиртоводочный завод», Россия), соевый шрот («Интер-Агро», Россия).

2.8 Определение активности ферментов

Метод определения протеолитической активности основан на гидролизе гемоглобина (или казеината натрия) исследуемым ФП до низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот с последующим осаждением непрогидролизованного белка трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и определением образовавшихся пептидов и свободных аминокислот. За единицу общей протеолитической активности (ПС) принимали такое количество фермента, которое за 1 мин при 30°С приводит гемоглобин (или казеинат натрия) в

неосаждаемое состояние ТХУ в количестве, соответствующем 1 мкмоль тирозина (1 мкмоль тирозина равен 0,181 мг) [130].

Метод HUT использовался для определения протеолитической активности ФП кислых протеаз в опытах *in vivo*. Метод основан на 30-мин ферментативном гидролизе гемоглобина при pH 4,7 и 40°C с последующим осаждением непрогидролизованного субстрата ТХУ. За единицу протеолитической активности принимается такое количество гидролизата, которое при абсорбции 275 нм равно 1,10 мг/см³ тирозина в 0,006N HCl [131].

Метод ФОЛП использовался для определения протеолитической активности ФП сериновой протеазы в опытах *in vivo*. За единицу протеолитической активности принято такое количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 г белка (казеина) в строго определенных стандартных условиях: температура 40°C, pH 10,5 и время гидролиза 1 ч [132].

Метод определения лейцинаминопептидазной активности (ЛАПА) основан на действии аминопептидазы на субстрат L-лейцин-пара(4)-нитроанилид с высвобождением пара-нитроанилина, окрашенного в желтый цвет вещества [133].

Метод определения ксиланазной активности основан на измерении скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС) методом Шомоди-Нельсона при гидролизе ксилана из древесины березы. За единицу ксиланазной активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль ВС (в ксилозном эквиваленте) из 1%-ного раствора ксилана за 1 мин при 50°C и pH 5,0 [134].

Метод определения β-глюканазной активности основан на измерении скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС) методом Шомоди-Нельсона при гидролизе β-глюкана ячменя. За единицу β-глюканазной активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль ВС (в глюкозном эквиваленте) из 1%-ного раствора β-глюкана за 1 мин при 50°C и pH 5,0 [134].

2.9 Определение концентрации белка

Содержание белка определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА) [135].

2.10 Электрофорез в полиакриламидном геле

Белковый электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (ДДС-NA) проводили в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra System фирмы «BioRad» (США).

При изготовлении пластин (70x80x0,75 мм) с ПААГ для электрофореза в денатурирующих условиях (ДДС-ЭФ) с концентрирующим (4%) и разделяющим (12%) гелями использовали реактивы и наборы производства фирмы «Helicon» (Россия). Окраску белка в гелях производили красителем Coomassie-Brilliant Blue G-250 производства Helicon (Россия). Перед электрофорезом исследуемые растворы ферментов предварительно обрабатывали 1% ДДС-Na и 5% β -меркаптоэтанолом при 100°C в течение 15 мин.

Для определения молекулярной массы использовали смеси белков-маркеров (14,4–97 кДа и 20–116 кДа) – набор SDS-PAGE Standards, Low Range («Bio-Rad», США).

2.11 Определение pH- и температурных оптимумов ферментных препаратов

Определение pH-профиля протеолитической активности в ФП проводили при 30°C в диапазоне значений pH от 3,0 до 11,0. Для pH-профиля активности ксиланазы измерения проводили при 50°C в диапазоне значений pH от 3,0 до 9,0. Для pH-профиля активности ЛАП измерения проводили при 30°C в диапазоне значений pH от 4,0 до 11,0. Для создания растворов с заданным значением pH использовали 0,1 М универсальный буфер.

Определение температурного профиля активности кислой протеазы проводили при рН 4,7 в диапазоне температур от 30 до 70°C; температурного профиля активности щелочной протеазы – при рН 10,0 в диапазоне температур от 30 до 70°C; температурного профиля активности ксиланазы – при рН 5,0 в диапазоне температур от 25 до 90°C; температурного профиля активности ЛАП – при рН 5,0 в диапазоне температур от 30 до 90°C.

Результаты измерений отображали на графиках в процентах от максимального значения активности, наблюдаемой в оптимуме рН и температуры.

2.12 Определение термостабильности ферментных препаратов

Исследование термостабильности полученных ФП проводили при температуре от 30 до 70°C. В термостатируемую пробирку помещали раствор фермента и через определенные промежутки времени отбирали пробы, в которых определяли активности по отношению к субстратам в стандартных условиях (см. выше). Результаты отображали в виде зависимости остаточной активности после 90 минут инкубирования от температур, за 100% принимали начальную активность раствора фермента.

2.13 Анализ компонентного состава ферментных препаратов

Для фракционирования ФП использовали жидкостной хроматограф среднего давления FPLC фирмы «*Pharmacia*» (Швеция). Система FPLC состояла из двух насосов Р-500, миксера, инжектора, колонки с соответствующим носителем, ультрафиолетового проточного детектора (280 нм), самописца и коллектора фракций.

Обессоливание проводили методом ГПХ на колонке с носителем BioGel Р6, уравновешенной буфером 0,02 М bis-Tris/HCl, рН 6,8. Ионообменную хроматографию обессоленных препаратов проводили на колонке с носителем

Source 15 Q. Пробу, содержащую 10 мг белка, наносили на колонку, уравновешенную 0,02 М Bis-Tris/HCl, pH 6,8. Несвязавшийся белок смывали стартовым буфером, а связавшийся белок элюировали в градиенте ионной силы. Градиент задавали линейным изменением концентрации NaCl от 0 до 0,4 М при скорости потока 1 см³/мин (объем градиента 40 см³). Во фракциях, собранных в процессе хроматографирования, доводили значение pH до пяти, добавляя 10% (по объему) 1 М Na-ацетатного буфера с pH 5,0.

2.14 Методы анализа сусла и бражки

Кислотность сусла и бражки определяли титрованием 0,1Н раствором щелочи. Один градус кислотности соответствует 1 см³ 1Н раствора щелочи, расходуемой на нейтрализацию кислот, содержащихся в 20 см³ фильтрата [136].

Концентрацию сухих веществ в сусле и видимую концентрацию сухих веществ в фильтрате бражки определяли сахарометрическим методом [136].

Объемную концентрацию спирта определяли на автоматическом приборе Densimat-Alcomat2 («Gibertini Elettronica S.R.L.», Италия) в дистилляте, полученном после отгонки его из бражки.

Определение несброженных углеводов в бражке проводили колориметрическим методом, основанным на расщеплении сложных углеводов до моносахаров в сильноокислой среде с последующей их дегидратацией и образованием оксиметилфурфурола, который, вступая в реакцию с антроном, образует комплексное соединение синевато-зеленого цвета [136].

Влажность измеряли на приборе ЭВЛАС-2М («Сибагроприбор», Россия) согласно инструкции.

2.15 Структура экспериментальных исследований

Основные этапы исследований выполнялись в соответствии со схемой, представленной на рисунке 9.



Рисунок 9 – Структурная схема экспериментальных исследований

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Получение рекомбинантных штаммов

Литературные данные свидетельствуют об актуальности применения грибных протеаз в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства. Именно с этой целью мы проводили исследования по созданию на основе реципиентного штамма *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻ продуцентов наиболее значимых и, в то же время, дефицитных на рынке коммерческих ФП грибных протеаз: кислой аспаргатной протеазы (пенициллопепсина), лейцинаминопептидазы и сериновой протеазы (оризина).

3.1.1 Создание продуцента пенициллопепсина – трансформация штамма *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻ плазмидой pPrXEG_PEP

Для получения высокоактивного продуцента ПЕП была проведена трансформация штамма *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻ целевой плазмидой pPrXEG_PEP, содержащей ген ПЕП *P. canescens* под ксиланазным промотором, совместно с плазмидой pSTA10 (*niaD*⁺), соотношение целевой плазмиды и pSTA10 составляло 10:1. Было получено 94 трансформанта, частота трансформации составила в среднем 9 трансформантов на 1 мкг трансформированной ДНК. Для первоначального скрининга трансформанты, выросшие на агаризованной среде с 1,2М сорбитолом и NaNO₃, были пересеяны на селективную среду РМ с NaNO₃ (состав среды приведён в разделе 2.5). Далее трансформанты культивировали в качалочных колбах в течение 6 суток, по окончании ферментации отбирали пробы КЖ для определения ПС (используя гемоглобин в качестве субстрата) и концентрации белка. В качестве контроля для всех опытов использовали реципиентный штамм *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻. Полученные результаты (таблица 5) продемонстрировали существенное повышение уровня ПС в КЖ в большинстве выделенных трансформантов, что

свидетельствует об успешной гомологичной экспрессии гена пенициллопепсина реципиентным штаммом *P. canescens*.

Таблица 5 – Общая протеолитическая активность и концентрация белка в культуральной жидкости трансформантов *P. canescens* (колбы, 144 ч, 30°C)

Трансформант	ПС, ед./см ³ pH 4,7, 30°C (гемоглобин)	Белок, мг/см ³
Контроль <i>P. canescens</i> RN3-11-7 <i>niaD</i> ⁻	1,2	9
cl 1	15	10
cl 2	2	10
cl 3	120	14
cl 4	110	15
cl 5	2	10
cl 6	5,6	10
cl 7	2	10
cl 8	2	11
cl 9	10	10
cl 10	98	17
cl 11	2	11
cl 12	3	11
cl 13	87	13
cl 14	81	14
cl 15	94	14
cl 16	19	10
cl 17	34	12
cl 18	8	10
cl 19	2	9
cl 20	28	11
cl 21	10	10
cl 22	2	10
cl 23	14	9
cl 24	13	11
cl 25	2	9
cl 26	54	10
cl 27	10	9
cl 28	2	8
cl 29	19	10
cl 30	20	10
cl 31	34	12
cl 32	2	9

Трансформант	ПС, ед./см ³ рН 4,7, 30°C (гемоглобин)	Белок, мг/см ³
cl 33	2	9
cl 34	2	8,5
cl 35	13	9
cl 36	14	10
cl 37	23	10
cl 38	33	11
cl 39	22	10
cl 40	36	11
cl 41	22	11
cl 42	44	11,7
cl 43	41	11,4
cl 44	60	13,7
cl 45	20	9
cl 46	1	9
cl 47	31	11
cl 48	16	10
cl 49	36	11
cl 50	47	11
cl 51	22	10
cl 52	1	9
cl 53	1	9
cl 54	7	9
cl 55	7	9
cl 56	1	8
cl 57	1	9
cl 58	1	9
cl 59	37	10
cl 60	23	10
cl 61	1	9
cl 62	1	8
cl 63	22	10
cl 64	1	10
cl 65	46	11
cl 66	11	8
cl 67	39	11
cl 68	102	13
cl 69	1	8
cl 70	27	10
cl 71	75	11
cl 72	95	13

Трансформант	ПС, ед./см ³ рН 4,7, 30°C (гемоглобин)	Белок, мг/см ³
cl 73	55	12
cl 74	34	10
cl 75	46	10
cl 76	58	11
cl 77	22	9
cl 78	42	11
cl 79	1	10
cl 80	1	8
cl 81	10	8
cl 82	85	12
cl 83	1	12
cl 84	12	11
cl 85	40	13
cl 86	18	11
cl 87	9	10
cl 88	1	11
cl 89	34	12
cl 90	51	14
cl 91	33	12
cl 92	1	11
cl 93	1	10
cl 94	1	11

Трансформанты с максимальной активностью были отобраны для анализа белкового состава с помощью ДДС-ЭФ. На электрофореграмме КЖ всех отобранных трансформантов (рисунок 10) наблюдалась полоса с молекулярной массой 43 кДа, предположительно, принадлежащая ПЕП.

На основании полученных результатов были отобраны 3 штамма-продуцента (№№ 3, 4 и 68), протеолитическая активность которых была в 100–120 раз выше, чем у исходного (реципиентного) штамма (таблица 5), они были подвергнуты вторичной проверке по описанной выше процедуре (пересев на чашки Петри с последующим культивированием в качалочных колбах). Уровень ПС в КЖ после вторичной проверки практически соответствовал наблюдаемой при первичной проверке трансформантов (ср. таблицы 5 и 6).

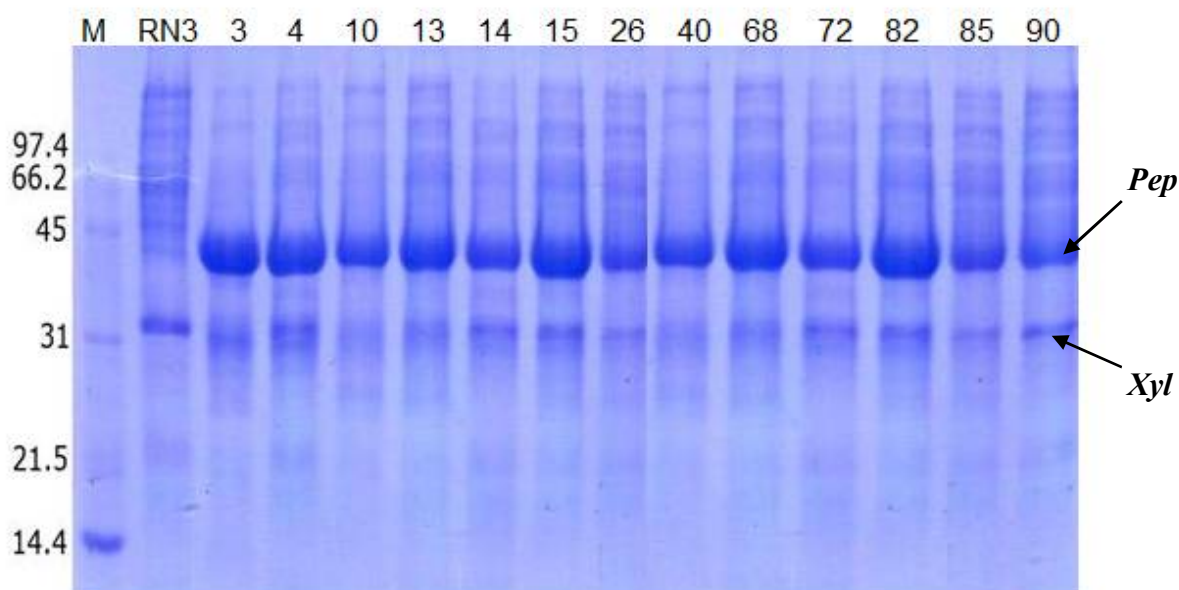


Рисунок 10 – Электрофореграмма образцов культуральной жидкости
отобранных трансформантов

Таблица 6 – Активности целевых ферментов и концентрация белка в
культуральной жидкости наиболее активных трансформантов при вторичной
проверке (cl 3, 4, 68) (колбы, 144 ч, 30°C)

Трансформант	ПС, ед./см ³ pH 4,7, 30°C (гемоглобин)	КсА, ед./см ³ pH 5,0, 50°C (ксилан из древесины березы)	Белок, мг/см ³
Контроль	1,2±0,2	250±25,8	9±1,2
cl 3	117±5,0	160±18,9	17±1,9
cl 4	110±8,7	230±21	17±1,7
cl 68	103±6,3	90±12,2	16±1,5

Из отобранных вариантов наиболее активным являлся клон 4 (далее *P. canescens* *Per-4*), протеолитическая активность которого в КЖ 110 раз выше, чем у реципиентного штамма (1 и 110 ед./см³, соответственно), при этом ксиланазная активность уменьшилась незначительно (250 и 230 ед./см³, соответственно).

Таким образом, в результате трансформации плазмидой pPrXEG_PER был создан рекомбинантный штамм *P. canescens* *Per-4* – высокоактивный продуцент ПЕП (110 ед./см³ КЖ), который, при этом, сохранил способность к активному биосинтезу собственной ксиланазы (230 ед./см³ КЖ).

3.1.2 Создание продуцента пенициллопепсина и лейцинаминопептидазы – котрансформация штамма *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻ плазмидами pPrXEG_PEP и pPrAbf_Lap

С целью создания высокоактивного продуцента комплекса грибных протеаз (эндо- и экзопептидаз) была проведена котрансформация реципиентного штамма *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻ следующими плазмидами:

- pPrXEG_PEP, несущей ген *pepA* *P. canescens* под ксиланазным промотором;
- pPrAbf_Lap1, несущей ген *lap1* *A. oryzae* под арабинофуранозидазным промотором;
- pSTA10, несущей маркерный ген нитратредуктазы *niaD*.

В результате получили 22 трансформанта, из которых методом ПЦР с геномной ДНК гриба было отобрано шесть (№№ 2, 3, 4, 7, 8 и 21), содержащих оба целевых гена. Тестирование выбранных трансформантов на уровень ПС после культивирования в качалочных колбах позволило отобрать клон №7 (далее *P. canescens* RN3-11-7-7) с общей ПС в КЖ 63 ед./см³, а также с активностью ЛАПА в КЖ 24 ед./см³ (таблица 7).

Таблица 7 – Протеолитические активности и концентрация белка в культуральной жидкости отобранных трансформантов штамма *P. canescens* (колбы, 144 ч, 30°C)

Трансформант	ПС, ед./см ³ <i>pH</i> 4,7, 30°C, гемоглобин	ЛАПА, ед./см ³ <i>pH</i> 5,0, 30°C	Белок, мг/см ³
Контроль <i>P. canescens</i> RN3-11-7 <i>niaD</i> ⁻	0,9	0	9,6
cl 2	6,0	18	10,0
cl 3	0,4	14	10,6
cl 4	0,3	11	9,4
cl 7	63,0	24	13,0
cl 8	2,8	9	9,4
cl 21	4,6	8	9,4

КЖ отобранных трансформантов была проанализирована с помощью ДДС-ЭФ, на электрофореграмме (рисунок 11) было обнаружено две полосы с молекулярными массами 42–45 и 37 кДа, принадлежащие целевым белкам: ПЕП и ЛАП, соответственно.

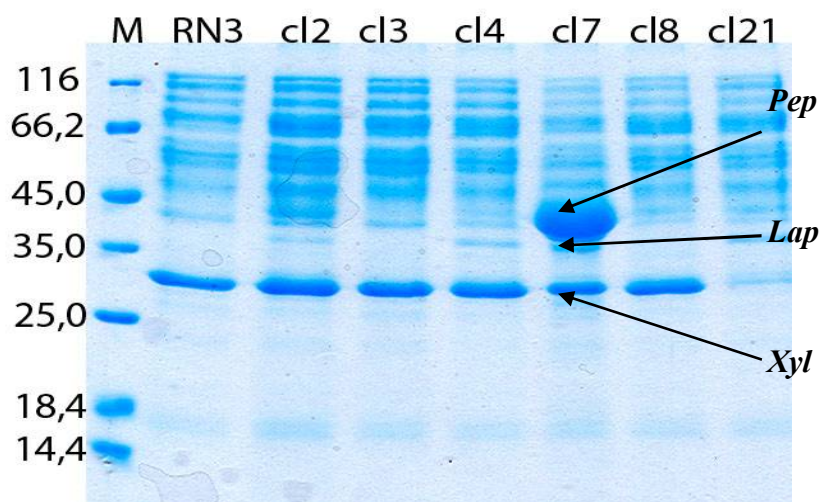


Рисунок 11 – Электрофореграмма культуральной жидкости трансформантов (c12, c13, c14, c17, c18, c121) и исходного штамма (RN3)

Отобранный трансформант *P. canescens* RN3-11-7-7 подвергли вторичной проверке с помощью культивирования в качалочных колбах, полученные данные подтвердили высокий уровень ПС в КЖ штамма (64 ед./см^3) и наличие активности в ЛАП в КЖ (таблица 8), которые практически совпадали с данными, полученными при первичном отборе трансформантов. При этом трансформант проявил высокую ксиланазную активность (230 ед./см^3 при активности реципиентного штамма 250 ед./см^3).

Таблица 8 – Целевые активности и концентрация белка в культуральной жидкости штаммов *P. canescens* RN3-11-7-7, (колбы, 144 ч, 30°C)

Штамм	ПС, ед./см ³ pH 4,7, 30°C, гемоглобин	ЛАПА, ед./см ³ pH 5,0, 30°C	КсА, ед./см ³ pH 5,0, 50°C	Белок, мг/см ³
Контроль	$1,0 \pm 0,2$	0,0	$250 \pm 25,8$	$10,0 \pm 1,2$

<i>P. canescens</i> RN3-11-7 <i>niaD</i> ⁻				
<i>P. canescens</i> RN3-11-7-7	64,0±2,5	25±2,4	230±20,1	14,0±1,5

Таким образом, в результате котрансформации плазмидами pPrXEG_PEP и pPrAbf_Lap1 был создан рекомбинантный штамм *P. canescens* RN3-11-7-7 – высокоактивный продуцент комплекса эндо- и экзопептидаз – ПЕП (64 ед./см³ в КЖ) и ЛАП (25 ед./см³ КЖ), который сохранил способность к активному биосинтезу собственной ксиланазы (230 ед./см³ КЖ).

3.1.3 Создание продуцента комплекса протеаз – котрансформация штамма *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻ плазмидами pPrXEG_alcPr_Aor, pPrXEG_PEP и pPrAbf_Lap1

На основании предыдущих опытов по успешной одновременной экспрессии в штамме *P. canescens* двух генов протеаз – ПЕП и ЛАП были проведены исследования по котрансформации реципиентного штамма тремя плазмидами с целью добавления сериновой щелочной протеазы из *A. oryzae* к имеющемуся протеолитическому комплексу.

Реципиентный штамм *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻ котрансформировали тремя плазмидами:

- pPrXEG_alcPr_Aor, несущей ген *alp* под ксиланазным промотором;
- pPrXEG_PEP, несущей ген *pepA* под ксиланазным промотором;
- pPrAbf_Lap1, несущей ген *lap* под арабинофуранозидазным промотором;
- pSTA10, несущей маркерный ген нитратредуктазы *niaD*.

Было получено 12 трансформантов, которые пересеяли на селективную среду РМ с NaNO₃ для первоначального скрининга. Выросшие на селективной среде клоны культивировали в качалочных колбах для определения активностей по отношению к гемоглобину (рН 4,7), казеинату натрия (рН 8,0) и L-лейцин-*n*-нитроанилиду (рН 5,0). В качестве контроля использовали реципиентный штамм

P. canescens RN3-11-7 *niaD*⁻. Полученные результаты (таблица 9) показали, что активность щелочной протеазы в КЖ (по отношению к казеинату натрия) у клонов №№ 3, 6 и 9 увеличилась до 2,4–5,0 ед./см³, т.е., оказалась в 6 раз больше, чем у исходного штамма, а активность ПЕП и ЛАП у всех трансформантов была на уровне контроля.

Таблица 9 – Протеолитические активности и концентрация белка в культуральной жидкости трансформантов *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻ (колбы, 144 ч, 30°C)

Трансформант	ПС, ед./см ³ pH 4,7, 30°C (гемоглобин)	ЛАПА, ед./см ³ pH 5,0, 30°C (L-лейцин-п- нитроанилид)	ПС, ед./см ³ pH 8,0, 30°C (казеинат натрия)	Белок, мг/см ³
Контроль <i>P.canescens</i> RN3-11-7 <i>niaD</i> ⁻	0,9	0,3	0,5	12,0
cl 1	0,9	0,3	1,7	11,0
cl 2	0,9	0,3	0,5	11,6
cl 3	0,9	0,3	5,0	13,0
cl 4	0,9	0,3	0,5	11,5
cl 5	0,9	0,3	0,5	11,7
cl 6	0,9	0,3	2,4	12,0
cl 7	0,9	0,3	0,5	13,0
cl 8	0,9	0,3	0,5	14,0
cl 9	0,9	0,3	3,0	13,8
cl 10	0,9	0,3	0,5	12,8
cl 11	0,9	0,3	0,5	13,4
cl 12	0,9	0,3	0,5	12,9

Результаты ДДС-ЭФ КЖ трансформантов показали (рисунок 12) наличие у клонов №№ 1, 3, 6, 9, 11 и 12 белковых полос с молекулярной массой около 37 и 27 кДа, предположительно принадлежащих сериновой щелочной протеазе *A. oryzae* (достоверность приведенных данных подтверждена последующими опытами, см. раздел 3.1.3.1 и приложение А). Белковые полосы, соответствующие молекулярным массам ПЕП (43 кДа) и ЛАП (37 кДа), на электрофореграмме КЖ полученных трансформантов отсутствовали.

У клонов с увеличенной экспрессией сериновой протеазы (№№ 1, 3, 6, 9, 11, 12) отсутствовала полоса в области 30 кДа, соответствующая Ксил *P. canescens*. Возможным объяснением отсутствия полосы, является гидролиз Ксил сериновыми протеазами в процессе пробоподготовки для проведения электрофореза.

Следует отметить, что на электрофореграмме КЖ клона №4 отсутствовали белковые полосы с высокой молекулярной массой, и наблюдалось образование «шмеров», представляющих продукты гидролиза белков. Предположительно, это также связано с действием сериновой протеазы.

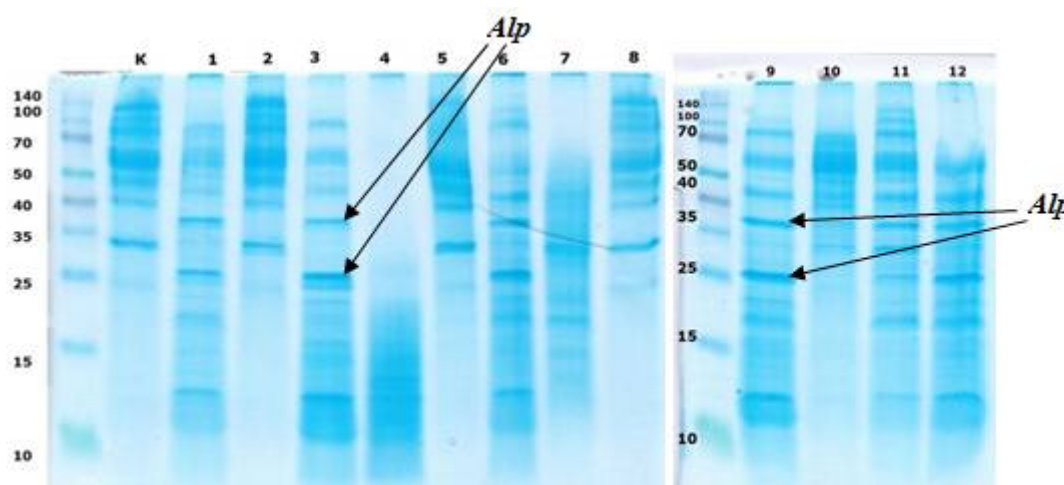


Рисунок 12 – Электрофореграмма культуральной жидкости трансформантов штамма *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻, полученных при котрансформации плазмидами pPrXEG_alcPr_Aor, pPrXEG_PEP и pPrAbf_Lap

Клоны №№ 3 и 9, обладавшие максимальной протеолитической активностью и продемонстрировавшие на электрофореграмм выраженные полосы, соответствовавшие молекулярной массе сериновой протеазы, а также клон №4 были пересеяны на среду РМ с нитратом натрия для повторной проверки.

Таким образом, в результате котрансформации штамма *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻ тремя целевыми плазмидами, несущими гены сериновой протеазы, ПЕП и ЛАП, у полученных трансформантов была обнаружена экспрессия только гена сериновой протеазы. При этом, предположительно, в результате высокой

гидролитической активности сериновой протеазы происходил гидролиз белков в условиях электрофоретического анализа белкового состава КЖ, что указывает на необходимость оптимизации методики пробоподготовки перед проведением ДДС-ЭФ.

3.1.3.1 Оптимизация методики электрофоретического анализа культуральной жидкости трансформантов *P. canescens*, имеющих активность сериновой протеазы

Для стабилизации белков КЖ при проведении ДДС-ЭФ используют различные способы инактивации протеаз: изменение pH, температуры, использование специфических ингибиторов [137].

С целью исследования белкового состава КЖ полученных трансформантов *P. canescens*, имеющих активность сериновой протеазы, было проведено глубинное культивирование отобранных клонов №№ 3, 4 и 9 (см. предыдущий раздел) в качалочных колбах на стандартной ферментационной среде. В качестве контроля использовали реципиентный штамм *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻. Для определения активности сериновой протеазы, концентрации белка и проведения ДДС-ЭФ пробы КЖ отбирали в динамике, начиная с 3 суток роста. Активность сериновой протеазы оценивали, измеряя ПС, используя в качестве субстрата казеинат натрия (pH 8,0, 30°C). Результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Динамика синтеза сериновой щелочной протеазы в культуральной жидкости трансформантов *P.canescens* (колбы, 144 ч, 30°C)

Время роста, сутки	Контроль <i>P.canescens</i> RN3-11-7 <i>niaD</i> ⁻		клон 3		клон 4		клон 9	
	ПС	Белок	ПС	Белок	ПС	Белок	ПС	Белок

3	0,5	10	2,4	11	1,1	7	1,7	10
4	0,5	10	3,4	13	1,5	13	2,2	9
5	0,5	10	5,0	12	1,7	12	2,4	10
6	0,5	12	5,2	12	1,8	12	3,6	10

Максимальную активность сериновой протеазы в КЖ трансформантов наблюдали на 6 сутки культивирования. Наиболее высокую активность – 5,2 ед./см³, показал клон №3; у клона №4 наблюдали лишь небольшое увеличение активности сериновой протеазы по сравнению с реципиентным штаммом (до 1,8 ед./см³).

Электрофоретический анализ проводили в пробах КЖ, отобранных на 3 и 6 сутки культивирования (рисунок 13). Пробы центрифугировали, для инактивации сериновой протеазы и стабилизации белков КЖ трансформантов в супернатанты КЖ вносили ингибитор сериновых протеаз фенилметансульфонилфторид (ФМСФ) в количестве 10% от объёма пробы 100мМ раствора (0,0174 г ФМСФ в 1 см³ изопропанола) или устанавливали pH 4,0, используя 1Н раствор HCl. КЖ трансформанта № 4 стабилизировали только добавлением ФМСФ (таблица 11).
Таблица 11 – Влияние значения pH и внесения ФМСФ на активность сериновой протеазы в культуральной жидкости трансформантов *P. canescens* (колбы, 144 ч, 30°C)

Трансформант	ПС, ед./см ³ <i>pH 8,0, 30°C, казеинат натрия</i>					
	КЖ, 3 сут. роста			КЖ, 6 сут. роста		
	pH естеств.	pH 4,0	ФМСФ	pH естеств.	pH 4,0	ФМСФ
<i>P.canescens RN3-11-7 niaD⁻</i>	0,5	н.о.	н.о.	0,5	н.о.	н.о.
Клон 3	2,4	1,1	0,5	5,2	3,9	0,5
Клон 4	1,1	н.о.	0,5	1,8	н.о.	0,5
Клон 9	1,7	1,5	0,5	3,6	2,0	0,5

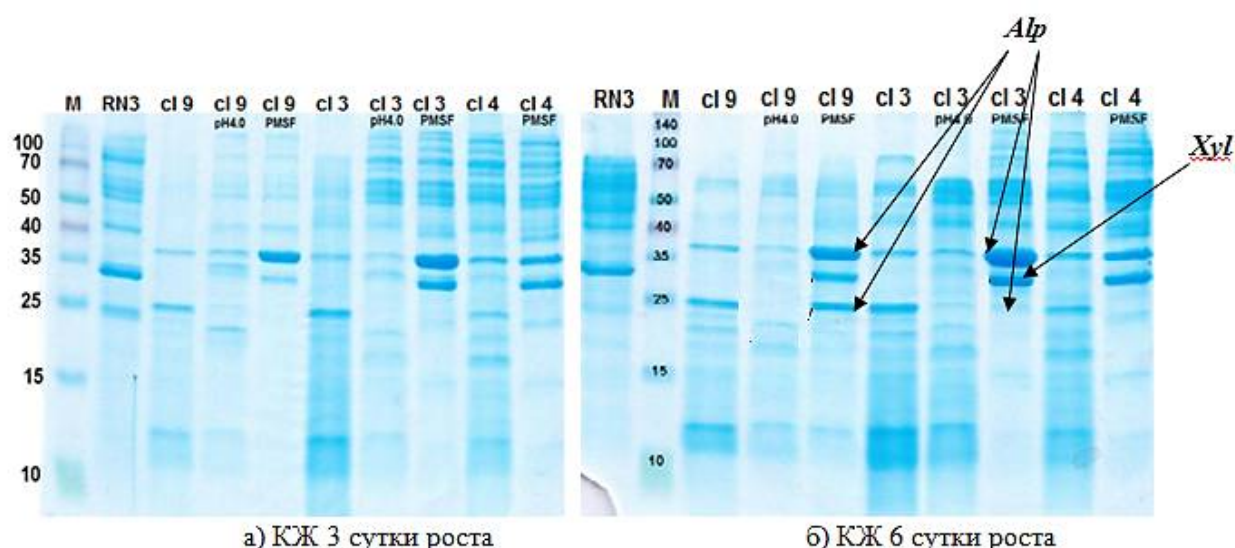


Рисунок 13 – Влияние способа стабилизации образцов КЖ трансформантов *P. canescens* на результаты ДДС-ЭФ

Смещение значения рН КЖ в кислую зону приводило к снижению протеолитической активности трансформантов, в среднем, в 1,5–2 раза, но не обеспечивало полного ингибирования сериновой протеазы, и соответственно, не обеспечивало достаточную стабилизацию белков КЖ при ДДС-ЭФ, что подтверждается отсутствием ярко выраженных полос на электрофореграмме (рисунок 13). Только внесение ФМСФ позволило полностью осуществить ингибирование активности сериновой протеазы у трансформантов *P. canescens*, что привело к появлению на электрофореграмме (рисунок 13) четких полос, соответствующих сериновой протеазе (37 и 27 кДа) и Ксил (30 кДа) (достоверность приведенных данных подтверждается масспектрометрическим анализом, см. приложение А).

3.1.4 Создание продуцента сериновой протеазы – трансформация штамма *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻ плазмидой pPrXEG_alcPr_Aor

На следующем этапе с целью повышения частоты трансформации штамм *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻ трансформировали только одной целевой плазмидой – pPrXEG_alcPr_Aor, несущей ген сериновой протеазы,

Было получено 97 трансформантов. Выросшие на селективной среде РМ с NaNO_3 трансформанты культивировали в качалочных колбах для скрининга по общей протеолитической активности, определённой по казеинату натрия в качестве субстрата (рН 8,0, 30°C). Результаты для наиболее активных вариантов представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Протеолитическая активность и концентрация белка в культуральной жидкости наиболее активных трансформантов *P. canescens* (колбы, 144 ч, 30°C)

Трансформант	ПС, ед./см ³ рН 8,0,30°C (казеинат натрия)	Белок, мг/см ³
Контроль <i>P.canescens</i> RN3-11-7 <i>niaD</i> ⁻	0,5	10
5	2,1	12
6	3,9	13
12	3,5	12
22	3,5	12
25	6,5	13
35	1,3	10
37	1,9	11
49	2,4	11
51	3,1	11

Трансформанты с максимальной активностью (№№ 6, 12, 22 и 25) были отобраны для анализа с помощью ДДС-ЭФ. Для стабилизации КЖ при проведении электрофореза сериновую протеазу ингибировали 10% 100мМ ФМСФ. Данные электрофоретического анализа (рисунок 14) подтвердили присутствие в КЖ трансформантов белковых полос с молекулярной массой около 37 кДа (преимущественно) и 27 кДа, принадлежащих сериновой протеазе *A. oryzae*. Для дальнейших исследований был выбран трансформант 25 (далее *P. canescens Oryzin-25*) с активностью сериновой протеазы в КЖ 6,5 ед./см³.

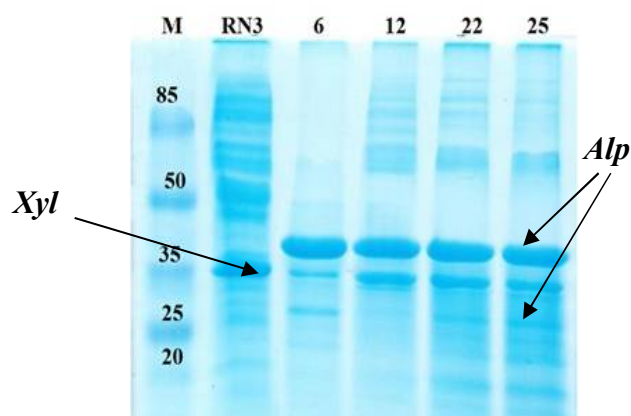


Рисунок 14 – Электрофореграмма образцов культуральной жидкости отобранных трансформантов, полученных в результате трансформации *P. canescens* RN3-11-7 *niaD* плазмидой pPrXEG_alcPr_Aor

3.1.4.1 Профили pH- и температурной зависимости активности сериновой протеазы штамма *P. canescens* Oryzin-25

С целью определения оптимальных условий действия сериновой протеазы нового штамма *P. canescens* Oryzin-25, в фильтрате КЖ, полученной после культивирования продуцента в качалочных колбах, были определены профили pH- и температурной зависимости активности этого фермента (рисунок 15). В кислой зоне pH от 3,0 до 6,0 протеолитическую активность определяли по отношению к гемоглобину, а в щелочной зоне pH от 7,0 до 12,0 – по отношению к казеинату натрия, используя 0,1М универсальный буфер.

Определение оптимумов температуры (30–90°C) проводили, используя 0,1М карбонатно-бикарбонатный буфер, при pH 10,0, измеряя активность сериновой протеазы по отношению к казеинату натрия. Оптимальными считали pH и температуру, при которых сериновая протеаза проявляла не менее 80% активности от максимальной.

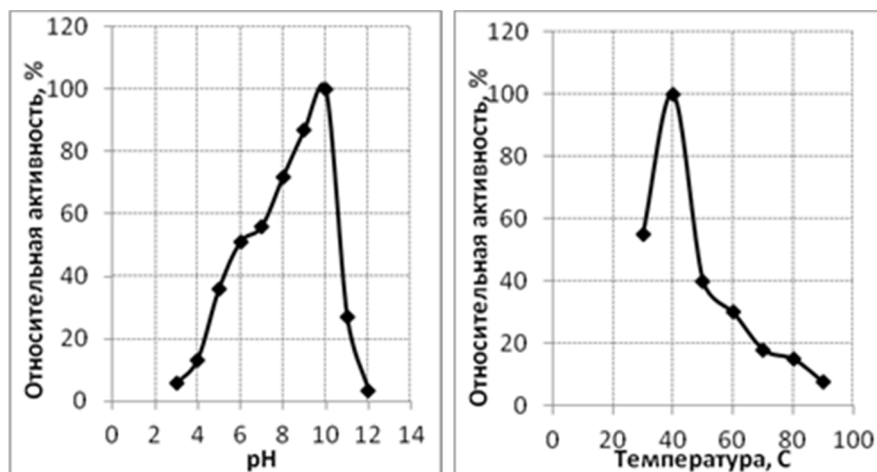


Рисунок 15 – Профили pH- и температурной зависимости сериновой протеазы штамма *P. canescens Oryzin-25*

Оптимум действия сериновой протеазы наблюдали при 40°C и pH 9,0–10,0, при увеличении pH выше значения pH-оптимума происходило резкое снижение ПС. В области нейтральных значений pH 6,0–7,0 сериновая протеаза сохраняла более 50% активности, при pH 8,0 фермент проявлял около 70% от максимального значения ПС. В слабокислой области при pH 5,0 ПС составляет 36% от максимальной.

Повышение или понижение температуры на 10°C по сравнению с температурным оптимумом приводило к снижению активности сериновой протеазы на 60 и 45%, соответственно.

Учитывая полученные данные, дальнейшие измерения активности сериновой протеазы производили в оптимуме действия фермента – при pH 10,0 и 40°C.

3.1.4.2 Индукция биосинтеза сериновой протеазы штаммом *P. canescens Oryzin-25* при глубинном культивировании

Для исследования возможности индуцирования биосинтеза сериновой протеазы шт. *P. canescens Oryzin-25* при глубинном культивировании, в ферментационную среду вносили в качестве индукторов казеинат натрия,

панкреатический гидролизат казеина, пептон, а также соевую муку в концентрации 2%. Данная концентрация была выбрана на основании результатов предварительных опытов по оптимизации ферментационных сред.

После 6 суток ферментации были отобраны пробы КЖ для анализа активности сериновой протеазы и концентрации белка. Результаты представлены в таблице 13.

Индуктирующим эффектом обладали соевая мука и пептон – при введении их в состав ферментационных сред уровень активности сериновой протеазы увеличивался на 50% и 13%, соответственно. Казеинат натрия не влиял на процесс синтеза целевого фермента, внесение панкреатического гидролизата казеина приводило к снижению протеолитической активности.

Таблица 13 – Влияние индукторов в составе ферментационной среды на синтез щелочной протеазы штаммом *P. canescens Oryzin-25* (колбы, 144 ч, 30 °C)

Индуктор	pH	ПС, ед./см ³ pH 10,0, 40 °C казеинат натрия	Белок, мг/см ³
Без индуктора	6,0±0,1	16,0±1,0	13,0±0,4
Казеинат натрия	7,7±0,07	11,3±0,7	15,0±0,3
Гидролизат казеина панкреатический	7,0±0,07	15,2±1,3	12,3±0,5
Пептон	6,7±0,1	18,1±1,0	13,6±0,7
Соевая мука	6,6±0,2	24,0±2,5	19,4±1,2

На основании полученных результатов для проведения дальнейших исследований была выбрана модифицированная ферментационная среда с 2% соевой муки, на которой было проведено культивирование штамма *P. canescens Oryzin-25*, а также штамма *P. canescens Oryzin-3*, полученным при котрансформации реципиентного штамма *P. canescens RN3-11-7 niaD⁻* тремя целевыми плазмидами, несущими гены ПЕП, ЛАП и сериновой протеазы (таблица 14).

Таблица 14 – Сравнение активности сериновой протеазы и ксиланазы новых рекомбинантных штаммов при культивировании на модифицированной ферментационной среде (колбы, 144 ч, 30°C)

Штамм	pH	Белок, мг/см ³	ПС, ед./см ³ pH 10,0, 40°C казеинат натрия	КсА, ед./см ³ pH 5,0, 50°C
<i>P. canescens</i> <i>Oryzin-3</i>	6,5±0,07	18±1,8	21,9±1,7	218±4,0
<i>P. canescens</i> <i>Oryzin-25</i>	6,2±0,07	18,6±1,7	22,2±1,3	240±12

На основании полученных результатов для дальнейших исследований был выбран штамм *P. canescens Oryzin-25*, обладающий протеолитической и ксиланазной активностью.

Таким образом, в результате трансформации плазмидой pPrXEG_alcPr_Aor был получен рекомбинантный штамм *P. canescens Oryzin-25*, который продуцирует сериновую протеазу (22 ед./см³), сохраняя при этом собственную ксиланазную активность (245 ед./см³). Подобран состав ферментационной среды, содержащей дополнительно 2% соевой муки, способствующий повышению протеолитической активности штамма в 1,5 раза.

3.1.5 Исследование стабильности полученных рекомбинантных штаммов при последовательных пересевах

Исследования стабильности полученных новых рекомбинантных штаммов – продуцентов целевых ферментов включали в себя выбор агаризованной среды, обеспечивающей равномерный рост мицелия, накопление достаточного количества биомассы и сохранение активного посевного материала. Пересевы проводили в соответствии со схемой, представленной на рисунке 16.

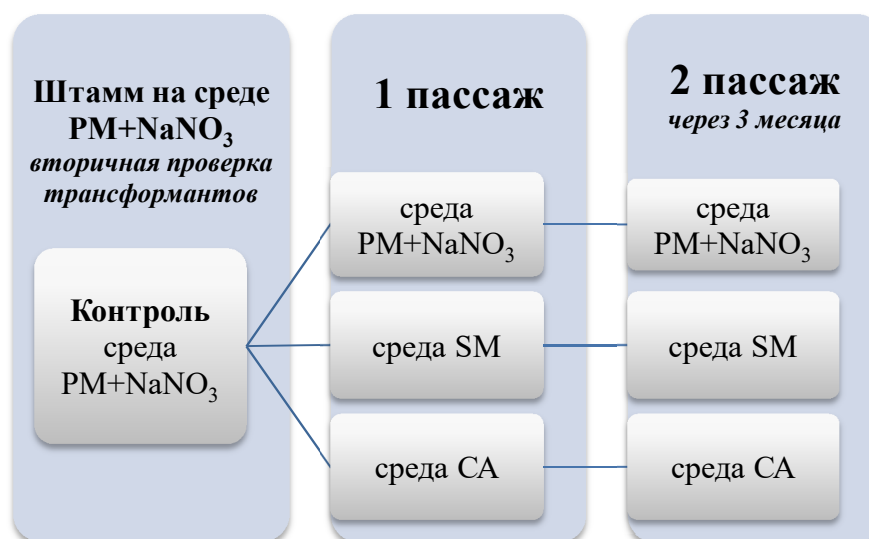


Рисунок 16 – Схема опыта по выбору агаризованной среды для сохранения активностей новых рекомбинантных штаммов

Последовательные пересевы штаммов (ведение посевного материала) осуществляли на трех видах агаризованных сред: на минимальной среде РМ+NaNO₃, применяемой для отбора трансформантов, среде SM, содержащей глюкозу, дрожжевой экстракт и КН₂РO₄, и среде СА, в состав которой входило агаризованное сусло плотностью 7°Б. Штаммы пересевали «уколом» на чашки Петри на указанных агаризованных средах и инкубировали при 30°С в течение 6 суток. По истечении срока инкубирования штаммы сравнивали по интенсивности роста и морфологии мицелия (рисунки 17, 18 и 19). Штаммы также проверяли на стабильность по признаку биосинтеза целевых ферментов при культивировании в качалочных колбах (таблицы 15, 16 и 17).

Таблица 15 – Влияние состава агаризованной среды на сохранение активности при пересевах штамма *P. canescens* Пер-4 – продуцента пенициллопепсина (колбы, 144 ч, 30 °C)

Варианты агаризованных сред	ПС, ед./см ³ pH 4,7, 30 °C гемоглобин	КсА, ед./см ³ pH 5,0, 50 °C	Белок, мг/см ³
Контроль PM + NaNO ₃	110±8,7	230±21,1	17±1,7
1 пассаж			
PM + NaNO ₃	100±5,0	223±21	17±1,5
SM	104±4,9	230±15	19±1,5
CA	98±9,0	200±5	19±2
2 пассаж			
PM + NaNO ₃	110±6	200±20	17±1,5
SM	120±4,8	210±12	18±1,2
CA	95±7,5	180±14	19±2

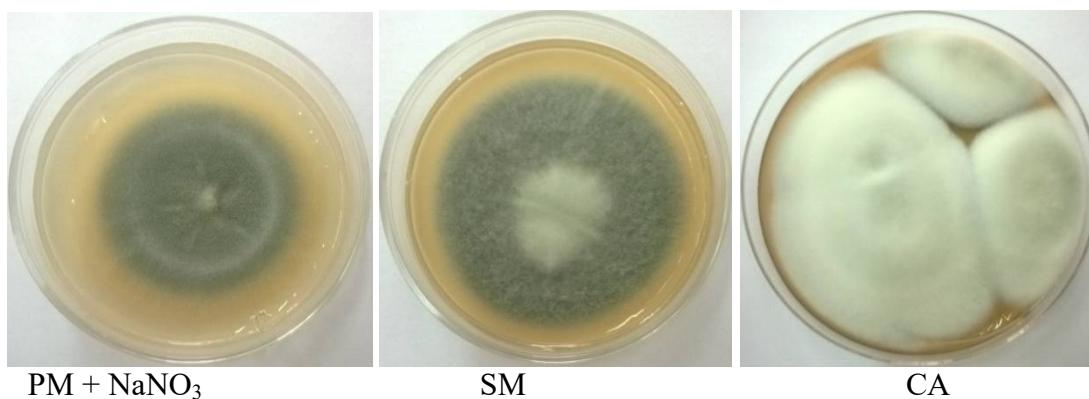


Рисунок 17 – Колонии штамма *P. canescens* Пер-4 – продуцента пенициллопепсина на различных агаризованных средах (144 ч, 30 °C)

Таблица 16 – Влияние состава агаризованной среды на сохранение активности при пересевах штамма *P. canescens* RN3-11-7-7 – продуцента пенициллопепсина и лейцинаминопептидазы (колбы, 144 ч, 30°C)

Варианты агаризованных сред	ПС, ед./см ³ <i>pH 4,7, 30°C</i> <i>гемоглобин</i>	КсА, ед./см ³ <i>pH 5,0, 50°C</i>	ЛАПА, ед./см ³ <i>pH 5,0, 30°C</i>	Белок, мг/см ³
Контроль	64±2,5	230±20,1	25±2,4	14±1,5
1 пассаж				
PM + NaNO ₃	60±2,5	230±12	30±3,7	14±2
SM	70±8,5	211±16	33±4,9	14±1
CA	60±5	220±9	35±3	14±1,5
2 пассаж				
PM + NaNO ₃	57±5	210±10	30±3,5	13±1,2
SM	65±3	210±10	36,5±5	15±1,7
CA	55±9	205±8,7	36±3	14±1,5

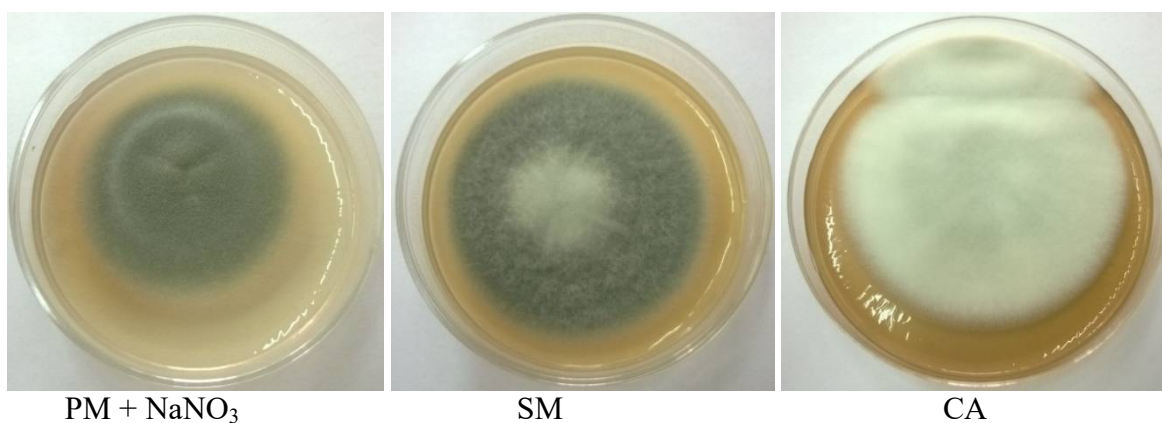
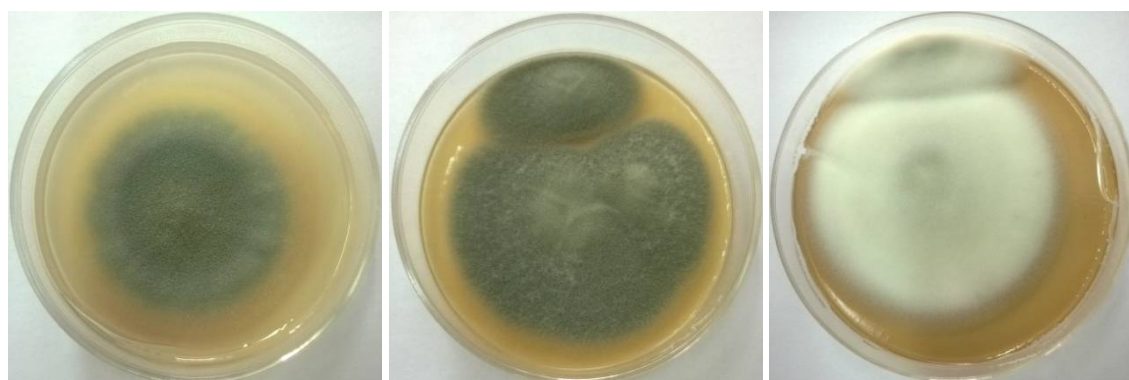


Рисунок 18 – Колонии штамма *P. canescens* RN3-11-7-7 – продуцента пенициллопепсина и лейцинаминопептидазы на различных агаризованных средах (144 ч, 30°C)

Таблица 17 – Влияние состава агаризованной среды на сохранение активности при пересевах штамма *P. canescens Oryzin-25* – продуцента сериновой протеазы (колбы, 144 ч, 30 °C)

Варианты агаризованных сред	ПС, ед./см ³ pH 10,0, 40 °C казеинат натрия	КсА, ед./см ³ pH 5,0, 50 °C	Белок, мг/см ³
Контроль	22±1,3	240±12	18,5±1,7
1 пассаж			
PM + NaNO ₃	23±2,5	243±15	18±1,7
SM	23±2,6	245±25	18±1,5
CA	16±2,5	250±30	19±2
2 пассаж			
PM + NaNO ₃	19±1,5	245±15	18±1,7
SM	23±2,8	250±15	19±1,5
CA	6±1,2	240±18	16±1,2



PM + NaNO₃

SM

CA

Рисунок 19 – Колонии штамма *P. canescens Oryzin-25* – продуцента сериновой протеазы на различных агаризованных средах (144 ч, 30 °C)

Очевидно, что оптимальной агаризованной средой для выращивания посевного материала новых рекомбинантных штаммов является среда SM, поскольку при использовании данной среды посевной материал приводил к стабильным и высоким результатам по биосинтезу целевых ферментов. Кроме того, колонии, выращенные на среде SM, имеют более интенсивное

спороношение по сравнению с колониями на среде СА и характеризуются большим накоплением биомассы по сравнению с минимальной средой.

Далее была определена стабильность уровня биосинтеза протеаз при длительном хранении штаммов на выбранной агаризованной среде (SM). Штаммы хранили на скошенном агаре и пересеивали каждые 3 месяца, в общей сложности штаммы прошли не менее 5 последовательных пассажей. После каждого пассажа штаммы культивировали в качалочных колбах на ферментационной среде (состав представлен в разделе 2.5), после окончания ферментации в КЖ определяли активности по отношению к гемоглобину (в случае *Pep-4* и *RN3-11-7-7*), казеинату натрия (в случае *Oryzin-25*) и L-лейцин-паранитроанилиду (в случае *RN3-11-7-7*). Результаты представлены на рисунке 20.

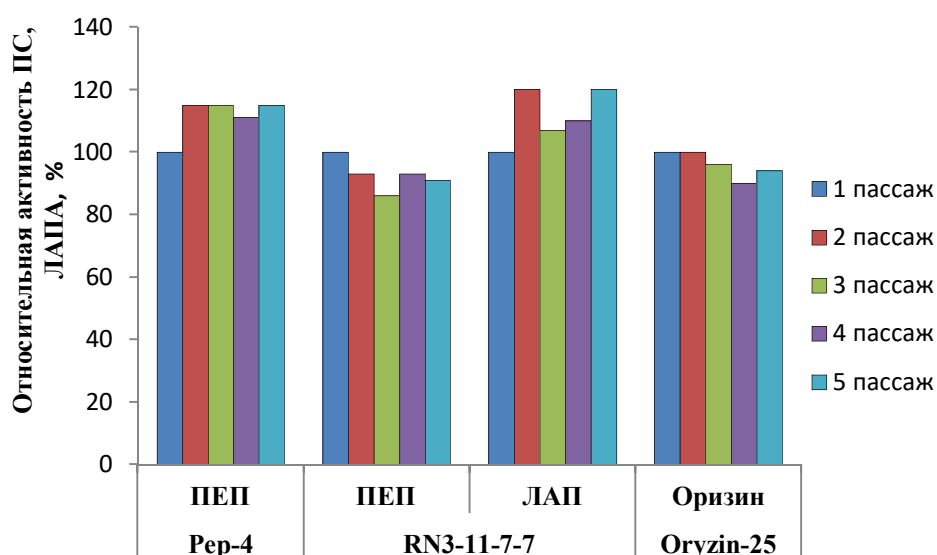


Рисунок 20 – Уровни активности в культуральной жидкости протеаз рекомбинантных штаммов при последовательных пересевах в процессе хранения (культивирование в колбах)

Из представленных данных на рисунке 20 видно, что активность ПЕП штамма *Pep-4* в процессе хранения и последовательных пересевов была выше на - 15% по сравнению с первым пассажем; активность ПЕП штамма *RN3-11-7-7* – находилась на уровне контрольного значения (91–93% от первого пассажа),

активность ЛАП штамма *RN3-11-7-7* – была выше на 10–20% от первого пассажа; активность Оризина штамма *Oryzin-25* – сохранялась на уровне контроля. Следовательно, полученные трансформанты не теряли активности после 5 пересевов в течение 1,5 лет.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о стабильности новых рекомбинантных штаммов по признаку биосинтеза протеаз при использовании для хранения посевного материала (пассажиrowания) агаризованной среды SM.

3.2 Получение сухих ферментных препаратов на основе новых рекомбинантных штаммов *P. canescens*

3.2.1 Получение сухого ферментного препарата пенициллопепсина на основе штамма *P. canescens* *Pep-4*

Культивирование штамма *P. canescens* *Pep-4* проводили в 10-л лабораторном ферментере АНКУМ-10 имеющего геометрический объём 10 дм³ и рабочий объём 7 дм³ (ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино), оснащённом системой автоматического регулирования pH, pO₂ и температуры, а также барботерами для подачи воздуха и двухъярусной мешалкой.

Получение инокулята и культивирование проводили на ферментационной среде, состав которой представлен в разделе 2.5. В качестве пеногасителя перед стерилизацией вносили 0,5% Пропиол Б-400.

Ферментер засеивали вегетативным посевным материалом (ВПМ), полученным следующим образом: споровой суспензией рекомбинантного штамма *P. canescens* *Pep-4* со средним значением ПС 120 ед./см³ (по гемоглобину) засеивали колбы с ферментационной средой и выращивали при постоянном перемешивании 250 об/мин в течение 24 ч при 28–30°C.

Параметры культивирования:

- Количество ВПМ – 10%;
- Температура культивирования – 28°C;

- pH – естественный;
- Расход воздуха – 3,5 дм³/мин;
- Продолжительность культивирования 120 ч.

Каждые 12 ч отбирали пробы КЖ и после удаления биомассы определяли общую протеолитическую активность и концентрацию растворимого белка (таблица 18). В процессе ферментации регистрировались pO_2 и pH. Интенсивность аэрации регулировали изменением скорости перемешивания.

Таблица 18 – Результаты ферментации рекомбинантного штамма *P. canescens*

Рер-4

Параметры ферментации			Результаты ферментации		
Время роста, ч	pO_2 , %	Обороты мешалки, об/мин	pH	ПС, ед./см ³ <i>pH 4,7, 30°C</i> <i>гемоглобин</i>	Белок, мг/см ³
0	100	300	4,2	0,0	10,5±0,9
12	32	640	4,2	0,0	9,8±0,9
24	32	760	4,7	11±1,9	10,0±0,7
36	31	600	5,1	37±2,7	10,8±0,7
48	32	540	5,2	57±9,5	11,8±2
60	27	480	5,2	73±5,5	12,8±0,4
72	32	460	5,2	117±20	14,0±1,7
84	31	420	5,2	124±10	15,5±1,8
96	31	390	5,3	156±10	16,6±1,5
108	32	370	5,3	160±10	20,3±1,1
120	30	350	5,3	179±26	21,2±2

По окончании ферментации отделение биомассы проводили центрифугированием. Концентрирование супернатанта КЖ осуществляли на ультрафильтрационном аппарате на полых волокнах УФЗ-15ПС («Фазеркрафт», Россия) с порогом отсечения 15 кДа. Сухой концентрированный ФП получали из ультраконцентрата (УК) КЖ на сушильной установке с псевдоожиженным слоем MIDI-GLATT («GLATT Ingenieurtechnik GmbH Weimar», Германия). Носителем для приготовления ФП служил пшеничные отруби, параметры сушки: температура на входе 70–80°C, скорость подачи воздуха 12–17 м³/час, скорость подачи рабочего раствора – около 3,5 см³/мин. Температура продукта при подаче

УК – около 23°C, в конце процесса высушивания температура не превышала 39°C. Характеристика полученного сухого ФП ПЕП представлена в таблице 19.

Таблица 19 – Характеристика ферментного препарата, полученного на основе штамма *P. canescens* *Per-4*

Продукт	Белок		ПС, <i>pH 4,7,30°C</i> <i>гемоглобин</i>		КсА, <i>pH 5,0; 50°C</i>
	мг/см ³	мг/г	ед./см ³	ед./г	ед./г
КЖ (слив из ферментёра)	21,2±1,7	-	179±13,4	-	н.о.
УК	73,0±5	-	565±25	-	н.о.
ПЕП (после распылительной сушки)	-	156±12	-	645±80	1223±92

Таким образом, методом распылительной сушки ультраконцентрата КЖ штамма *P. canescens* *Per-4*, наработанной в 10-л лабораторном ферментере, был получен экспериментальный образец сухого концентрированного комплексного ФП ПЕП, содержащий ПЕП (645 ед./г по гемоглобину) и Ксил (1223 ед./г).

3.2.2 Получение сухого ферментного препарата пенициллопепсина и лейцинаминопептидазы на основе штамма *P. canescens* *RN3-11-7-7*

Культивирование штамма *P. canescens* *RN3-11-7-7* проводили в ЦКП ФИЦ Биотехнологии РАН в лабораторной ферментационной установке КФ 104/3 в ферментёрах с геометрическим объемом 3 дм³ и рабочим объёмом 1,5 дм³, оснащенных системами автоматического регулирования pH, pO₂ и температуры, а также барботерами для подачи воздуха и двухъярусной мешалкой.

Получение инокулята и культивирование проводили на ферментационной среде, состав которой представлен в разделе 2.5. В качестве пеногасителя перед стерилизацией вносили 0,1% Лапрола.

Ферментер засевали ВПМ, полученным следующим образом: споровой суспензией рекомбинантного штамма *P. canescens* *RN3-11-7-7* со средним

значением ПС 70 ед./см³ (по гемоглобину) засевали колбы с ферментационной средой и выращивали при постоянном перемешивании 250 об/мин в течение 24 ч при 28–30°C.

Параметры культивирования:

- Количество ВПМ – 10% (0,9 дм³ ферментационной среды + 0,1 дм³ ВПМ);
- Температура культивирования – 28±0,2°C;
- рН – естественный;
- Расход воздуха – 0,5 дм³/мин;
- Продолжительность культивирования 168 ч.

Каждые 24 ч отбирали пробы КЖ и после удаления биомассы определяли общую протеолитическую активность, концентрацию растворимого белка, содержание ВС (до 3-х суток), и активность ЛАП (начиная с 3-х суток) (таблица 20). В процессе ферментации регистрировались следующие параметры: рО₂, температура, рН. Интенсивность аэрации регулировали изменением скорости перемешивания.

Таблица 20 – Результаты ферментации рекомбинантного штамма *P. canescens* RN3-11-7-7

Параметры ферментации			Результаты ферментации				
Время роста, ч	Обороты мешалки, об/мин	рО ₂ , %	рН	Белок, мг/см ³	ВС, мг/см ³	ПС, ед./см ³ рН 4,7, 30°C гемоглобин	ЛАПА, ед./см ³ рН 5,0, 30°C
0	270	100	4,1	10,4±0,3	0,3±0,03	0,6±0,07	0
24	350	85	4,2	9,6±0,2	1,7±0,7	1±0,5	0
48	470	37	4,7	9,6±0,2	0,4±0,14	2,5±0,5	следы
72	430	12	5,3	9,0±0,5	0	12±0,5	3±0,5
96	430	61	5,8	9,6±1	0	29±2,5	11±2,5
120	430	10	5,7	12,0±2	0	49±6,2	16±4
144	430	100	5,9	15,2±2,6	0	76±7,4	29±3
168	430	100	6,1	17,4±2,5	0	65±6,6	39±3

По окончании ферментации отделение биомассы проводили центрифугированием. Концентрирование супернатанта КЖ осуществляли на тангенциальной ультрафильтрационной системе («Merck Millipore», США) с пределом отсека 10 кДа. Сухой ФП получали из УК методом лиофильной сушки на установке Benchtop 9L ES («VirTis», США). Характеристика полученного ФП ПЕП-ЛАП приведена в таблице 21.

Таблица 21 – Характеристика ферментного препарата, полученного на основе культуральной жидкости штамма *P. canescens* RN3-11-7-7

ФП	Белок		ПС, <i>pH 4,7, 30°C</i> <i>гемоглобин</i>		КсА, <i>pH 5,0, 50°C</i>	ЛАПА, <i>pH 5,0, 30°C</i>	
	мг/см ³	мг/г	ед./см ³	ед./г	ед./г	ед./см ³	ед./г
КЖ (слив из ферментёра)	17,4±1,1	-	65±5	-	н.о.	39±2,5	-
УК	60,4±4	-	210±14	-	н.о.	136±8,7	-
ПЕП-ЛАП (после лиофильной сушки)	-	324±24	-	1588±132	15733±1169	-	550±35

Таким образом, путём лиофильного высушивания ультраконцентрата КЖ штамма *P. canescens* RN3-11-7-7, наработанной в 3-л лабораторном ферментёре, был получен экспериментальный образец сухого концентрированного комплексного ФП ПЕП-ЛАП, содержащий ПЕП (1588 ед./г по гемоглобину), ЛАП (550 ед./г) и Ксил (15733 ед./г).

3.2.3 Получение сухих комплексных ферментных препаратов протеаз на основе рекомбинантных штаммов *P. canescens*

На основе рекомбинантных штаммов *P. canescens* *Pep-4*, RN3-11-7-7 и *Oryzin-25* были получены лабораторные образцы сухих ФП путем осаждения ацетоном КЖ. Для этого штаммы культивировали в качалочных колбах объемом 750 см³; для штамма *P. canescens* *Pep-4* и RN3-11-7-7 использовали ферментационную среду, состав которой приведён в разделе 2.5; для *P. canescens*

Oryzin-25 использовали ферментационную среду с соевой мукой (раздел 3.1.4.2). Колбы засеивали споровой суспензией, условия культивирования описаны в разделе 2.5.

По окончании ферментации отделение биомассы проводили с помощью фильтров из нетканого материала, полученный фильтрат КЖ охлаждали при +4°C в течение 15–20 мин, затем смешивали с охлажденным при -20°C ацетоном в соотношении 1:2 (фильтрат КЖ:ацетон) при интенсивном перемешивании и оставляли на 20–30 минут для формирования осадка. После этого верхний слой жидкости декантировали, а оставшуюся жидкость с осадком центрифугировали 20 мин при 6000 об/мин. Полученный осадок высушивали до получения постоянной массы при комнатной температуре. В результате было получено 3 ацетоноосажденных препарата: ПЕП, ПЕП-ЛАП и Оризин. Путем смешивания полученных ФП ПЕП и Оризин в соотношении 1:1 был получен мультиэнзимный комплекс (МЭК). Характеристики полученных ацетоноосажденных ФП представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Характеристика ацетоноосажденных ферментных препаратов

ФП	Белок, мг/г	ПС, ед./г		ЛАПА, ед./г pH 5,0, 30°C	КсА, ед./г pH 5,0, 50°C
		pH 4,7, 30°C гемоглобин	pH 10,0, 40°C казеинат натрия		
ПЕП-А	273±20	1512±76	-	-	728±55
ПЕП-ЛАП-А	280±14	1172±60	-	125±6	1524±76
Оризин-А	300±20	-	340±20	-	4000±250
МЭК-А <i>ПЕП-А+Оризин-А в соотношении 1:1</i>	277±20	870±60	170±10	-	3140±220

Таким образом, с помощью осаждения ацетоном фильтрата КЖ штаммов *P. canescens* RN3-11-7-7, *Pep-4* и *Oryzin-25* наработанных в качалочных колбах, были получены лабораторные образцы сухих комплексных ФП: ПЕП, содержащий ПЕП (1512 ед./г по гемоглобину) и Ксил (728 ед./г); ПЕП-ЛАП содержащий ПЕП (1172 ед./г по гемоглобину), ЛАП (125 ед./г) и Ксил (1524 ед./г); Оризин, содержащий щелочную сериновую протеазу (340 ед./г по казеинату натрия) и Ксил (4000 ед./г). Был также получен МЭК, ПЕП+Оризин, содержащий ПЕП (870

ед./г по гемоглобину), щелочную сериновую протеазу (169 ед./г по казеинату натрия) и Ксил (3140 ед./г).

3.3 Масштабирование процесса культивирования рекомбинантных штаммов в условиях промышленного производства

С целью внедрения в производство новых штаммов – продуцентов протеаз и гемицеллюлаз и получения опытных промышленных партий комплексных ФП на заводе ООО «Агрофермент» были проведены испытания технологии культивирования рекомбинантных штаммов – *P. canescens* *Per-4* (продуцент ПЕП) и *P. canescens* *RN3-11-7-7* (продуцент ПЕП и ЛАП).

В качестве посевного материала использовали штаммы, хранящиеся на агаризованной среде не более 6 месяцев. ВПМ получали путем глубинного культивирования в качалочных колбах. Инокулят выращивали в течение 25 ч в инокуляторе с геометрическим объёмом 1 м³ и рабочим объёмом 0,5 м³ на ферментационной среде, состав которой приведён в разделе 2.5, при температуре 28–30°C и интенсивности перемешивания 279 об/мин. Для засева инокуляционной среды использовали 5 дм³ ВПМ.

Культивирование штаммов проводили на ферментационной среде, в состав которой входили оболочки сои, кукурузный экстракт и монофосфат калия (см. ниже) в рабочих ферментерах объемом с геометрическим объёмом 10 м³, оснащенных барботерами для подачи воздуха и турбинной мешалкой, двигатель которой позволяет развивать обороты до 199 об/мин.

Для осуществления процесса культивирования штаммов использовали аппаратно-технологическую схему, которая предусматривала смешивание кукурузного экстракта, КН₂РО₄, пеногасителя Лапрол с горячей водой (50–60°C) в смесителе при постоянном перемешивании; смешивание в отдельном реакторе гранулированной соевой оболочки (молотой) с холодной водой при медленном перемешивании; передачу с помощью роторно-пульсационного аппарата полученной суспензии в смеситель, в котором уже находятся остальные

компоненты питательной среды; подогрев общей смеси до 90°C и инкубирование в течение 40 мин при постоянном перемешивании; стерилизацию с использованием установки непрерывной стерилизации (УНС) под давлением и температуре 140°C с временем выдерживания 600 сек; охлаждение стерильной питательной среды до 40°C; передачу её в ферментер, охлаждение среды до 37°C и выдерживание в течение 4 ч при данной температуре (под давлением; мешалка с 100% оборотами – 199 об/мин и 100% аэрацией – 420 м³/ч).

Для осуществления ферментации в рабочих ферментерах объемом 10 м³ были определены следующие параметры:

- максимальная скорость перемешивания – 199 об/мин;
- коэффициент загрузки ферментеров – 0,6–0,65;
- режим расхода воздуха постоянный – 420 м³/ч;
- температура культивирования – 28–29°C;
- ферментационная среда – 4,5% оболочки сои гранулированной, 5% экстракта кукурузного сгущенного, 2,5% монофосфата калия, пеногаситель Лапрол;
- pH – естественный;
- давление в ферментере в процессе роста – 0,04 мПа;
- продолжительность ферментации – ок. 120 (117–134) ч.

Пробы КЖ из ферментеров отбирали через определенные промежутки времени, в фильтрате КЖ определяли общую протеолитическую активность, активность Ксил и концентрацию растворимого белка (таблица 23). Контроль микробиологической чистоты осуществляли с использованием общепринятых методов.

По окончании ферментации отделение биомассы проводили с помощью фильтр-пресса марки XAZG30 («Zhejiang Longyuan Filter Press», Китай) с фильтрующей поверхностью 30 м². Концентрирование фильтрата КЖ осуществляли на ультрафильтрационной установке Водопад УСП166,8-2-12 («Фильтропор Групп», Россия) со спиральными полимерными мембранами с

фильтрующей поверхностью 166 м³ с порогом отсечения 10 кДа. Сухой концентрированный ФП получали из УК на распылительной сушилке TALL-FORM компании «Fetterteck Ltd.» (Италия) с производительностью по испарённой влаге до 500 кг/час. Носителем для приготовления сухого ФП являлся крахмал, в качестве стабилизатора вносили хлорид натрия в количестве 10%.

Таблица 23 – Результаты ферментации рекомбинантных штаммов в условиях промышленного производства

Штамм	Время роста, ч	P, бар	t, °C	pH	Интенс. перемеш., %	Воздух, м ³ /ч	ПС, ед./см ³ pH 4,7, 30°C гемоглобин	КсА. ед./см ³	Белок мг/см ³
<i>P. canescens</i> <i>Per-4</i>	Засев	0,41	28,3	4,3	100	221	-	-	-
	45	0,40	28,4	6,2	100	214	12,5	60,3	4,9
	54	0,40	28,2	6,1	100	219	24,8	65,4	8,1
	69	0,40	28,4	6,0	100	220	40,3	70,6	8,4
	79	0,41	28,3	5,5	100	251	52,3	70,7	10,5
	93	0,40	28,3	5,5	100	253	59,4	146,6	11,7
	103	0,41	28,5	5,5	100	248	64,6	182,5	13,0
	117	0,41	27,0	5,5	100	266	75,7	184	14,6
<i>P. canescens</i> <i>RN3-11-7-7</i>	Засев	0,42	29,5	4,4	100	309	-	-	-
	44	0,41	29,8	5,1	100	375	26,0	65,6	8,0
	70	0,40	29,8	5,4	100	380	35,5	81,1	9,6
	86	0,40	28,2	5,7	100	384	37,5	93	10,3
	94	0,38	28,2	5,8	100	392	39,4	105,0	11,0
	110	0,39	28,1	6,0	100	390	47,8	116,6	11,7
	115	0,41	28,2	6,0	100	376	56,2	128,1	12,3
	134	0,42	28,2	6,1	100	379	52,6	120,6	13,9

Характеристика ФП, полученных в результате культивирования новых рекомбинантных штаммов в промышленном ферментере объемом 10 м³, приведены в таблице 24.

Промышленные образцы ФП соответствовали санитарно-микробиологическим показателям безопасности в соответствии с ТР ТС 029/2012.

Таблица 24 – Характеристика ферментных препаратов, полученных в производственных условиях на основе штаммов *P. canescens* *Per-4* и *RN3-11-7-7*

ФП	Белок, мг/см ³ /г	ПС, ед./см ³ /г <i>pH 4,7, 30°C</i> <i>гемоглобин</i>	КсА, ед./см ³ /г <i>pH 5,0, 50°C</i>	ЛАПА, ед./см ³ /г <i>pH 6,0, 40°C</i>
КЖ <i>P. canescens Per-4</i>	14,6±0,7	75,7±4	184,0±9	-
ПЕП сухой ФП	65±4	350±18	1080±50	-
КЖ <i>P. canescens RN3-11-7-7</i>	13,9±0,7	52,6±2,5	120,6±6	30±2
ПЕП-ЛАП сухой ФП	75±4	235±12	670±34	340±17

Таким образом, в условиях завода ООО «Агрофермент», методом распылительной сушки ультраконцентратов КЖ штаммов *P. canescens Per-4* и *P. canescens RN3-11-7-7* наработанных в 10 м³ промышленных ферментерах, были получены опытно-промышленные партии сухих концентрированных комплексных ФП: ПЕП, содержащий ПЕП (350 ед./г по гемоглобину) и Ксил (1075 ед./г); ПЕП-ЛАП, содержащий ПЕП (235 ед./г по гемоглобину), ЛАП (340 ед./г) и Ксил (670 ед./г) (Приложение В). Способ получения ФП подтверждается патентом РФ (Приложение Б).

3.4 Свойства и состав ферментных препаратов, полученных с помощью новых рекомбинантных штаммов *P. canescens*

3.4.1 pH и температурные оптимумы целевых активностей

Для всех полученных ФП были определены pH и температурные оптимумы активности по отношению к различным субстратам: гемоглобину (в случае ФП ПЕП и ПЕП-ЛАП), казеинату натрия (в случае ФП Оризин), L-лейцин-паранитроанилиду (в случае ФП ПЕП-ЛАП), ксилану – для всех ФП (таблица 25).

Максимальная активность кислой протеазы в ФП ПЕП и ПЕП-ЛАП наблюдали при pH 4,0–5,0 и температуре 50–55°C. ЛАП проявлял максимальную активность при pH 8,0–9,0 и температуре 70°C. Максимальная активность сериновой протеазы в ФП Оризин находится в диапазоне pH 9,5–11,0 и температуры 30–40°C. Максимальная активность по отношению к ксилану была одинакова во всех ФП и находилась в диапазоне pH 3,5–4,5 и температуры 55–65°C.

Таким образом, ФП, полученные различными способами (как лабораторные, так и промышленные), имели одинаковые температурные и pH-оптимумы действия на соответствующие субстраты, поэтому дальнейшие изучения свойств проводили на примере промышленных ФП (ПЕП-П и ПЕП-ЛАП-П) и лабораторном ФП Оризин.

Таблица 25 – pH и температурные оптимумы активности новых ферментных препаратов, полученных на основе рекомбинантных штаммов *P. canescens*

ФП	Свойства ФП					
	ПС		ЛАПА		КсА	
	pH-опт.	Термоопт.	pH-опт.	Термоопт.	pH-опт.	Термоопт.
ПЕП-Р <i>Распылительная сушка</i>	4,0–5,0	50–55	-	-	3,5–4,5	55–65
ПЕП-А <i>Осаждение ацетоном</i>	4,0–5,0	50–55	-	-	3,5–4,5	55–65
ПЕП-П <i>Промышленный</i>	4,0–5,0	50–55	-	-	3,5–4,5	55–65
ПЕП-ЛАП-А <i>Осаждение ацетоном</i>	4,0–5,0	50–55	8,0–9,0	70	3,5–4,5	55–65
ПЕП-ЛАП-Л <i>Липофильная сушка</i>	4,0–5,0	50–55	8,0–9,0	70	3,5–4,5	55–65
ПЕП-ЛАП-П <i>Промышленный</i>	4,0–5,0	50–55	8,0–9,0	70	3,5–4,5	55–65
Оризин <i>Осаждение ацетоном</i>	9,5–11,0	30–40	-	-	3,5–4,5	55–65

3.4.2 Термостабильность ферментов

Стабильность ферментов, входящих в состав ФП определяли по остаточной активности после 90 мин инкубирования при температурах от 30 до 70°C и pH 6,5 (рисунок 21).

ФП ПЕП-П и ПЕП-ЛАП-П содержали (одинаковую) кислую протеазу, и имели сходную термостабильность при измерении активности по гемоглобину. Фермент сохранял 100% активность после 90 минут инкубирования при температуре от 30 до 50°C. При 60–70°C происходила практически полная инактивация ферментов. Фермент ЛАП сохранял 100% активности только при 30°C, при 40°C сохранял 80% активности, при 50°C – лишь 40%. При 60–70°C фермент полностью инактивировался.

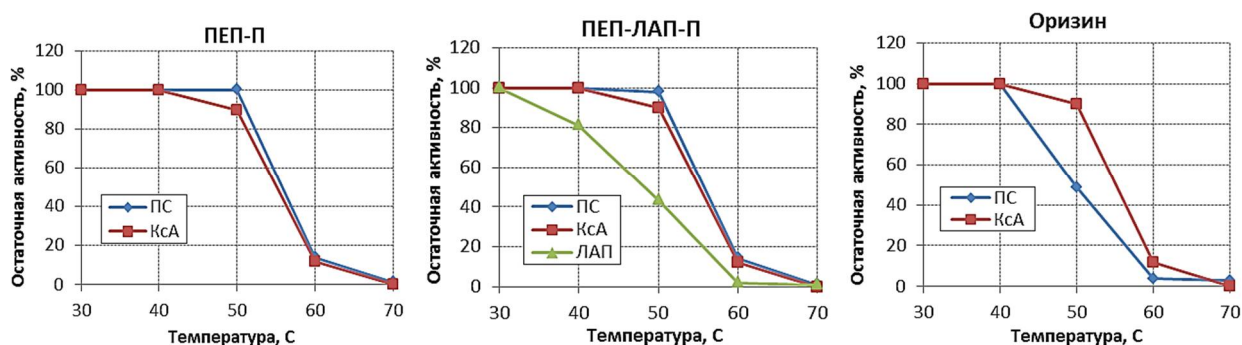


Рисунок 21 – Остаточная активность ферментных препаратов

(а) ПЕП-П, (б) ПЕП-ЛАП-П, (в) Оризин после инкубирования в течение 90 мин (рН 6,5)

Условия: инкубирование в течение 90 мин, температура 30-70°C, рН 6,5.

Условия измерения остаточной активности ФП по отношению к соответствующим субстратам: ПС ПЕП и ПЕП-ЛАП – по гемоглобину (рН 4,7, 30°C),

ПС Оризин – по казеинату натрия (рН 10,0, 40°C),

ЛАПА ПЕП-ЛАП – по L-лейцин-паранитроанилиду (рН 5,0, 30°C),

КсА – по ксилану березы (рН 5,0, 50°C).

Сериновая протеаза в ФП Оризин была стабильна после 90 минут инкубирования при температуре 30–40°C. При 50°C осталось 50% от общей активности. При 60–70°C фермент полностью инактивировался.

Термостабильность Ксил во всех препаратах была одинакова. Фермент сохранял 100% активности при температурах от 30 до 50°C, при 60°C сохранялось лишь 12% от активности, при 70°C происходила полная инактивация фермента.

3.4.3 Компонентный состав ферментных препаратов

Компонентный состав ФП был определён с помощью хроматографического фракционирования с использованием метода анионообменной хроматографии среднего давления (FPLC) на колонке с носителем Source 15Q.

Препараты (10 мг), предварительно обессоленные методом гель-проникающей хроматографии на носителе Bio-Gel P6, фракционировали на колонке Source 15Q (1 см³) в линейном градиенте 1 М NaCl (20 мМ Bis-Tris/HCl, pH 6.8). На рисунках 22–24 представлены хроматографические профили фракционирования ФП ПЕП-П, ПЕП-ЛАП-П и Оризин.

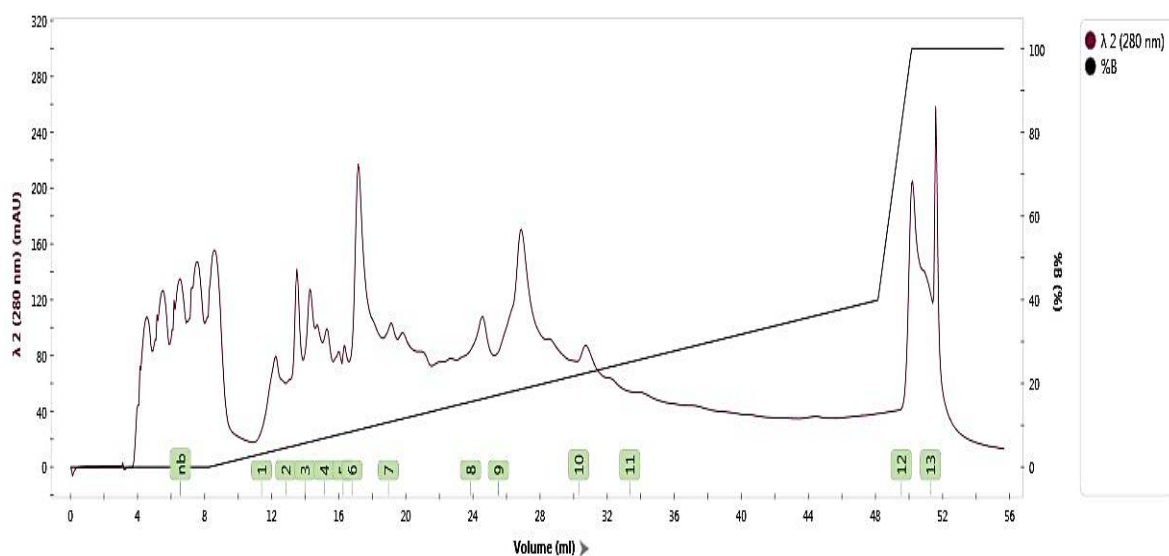


Рисунок 22 – Хроматографический профиль при фракционировании ферментного препарата ПЕП-П на колонке с носителем Source 15Q (на хроматограмме приведены номера фракций, а также градиент концентрации NaCl)

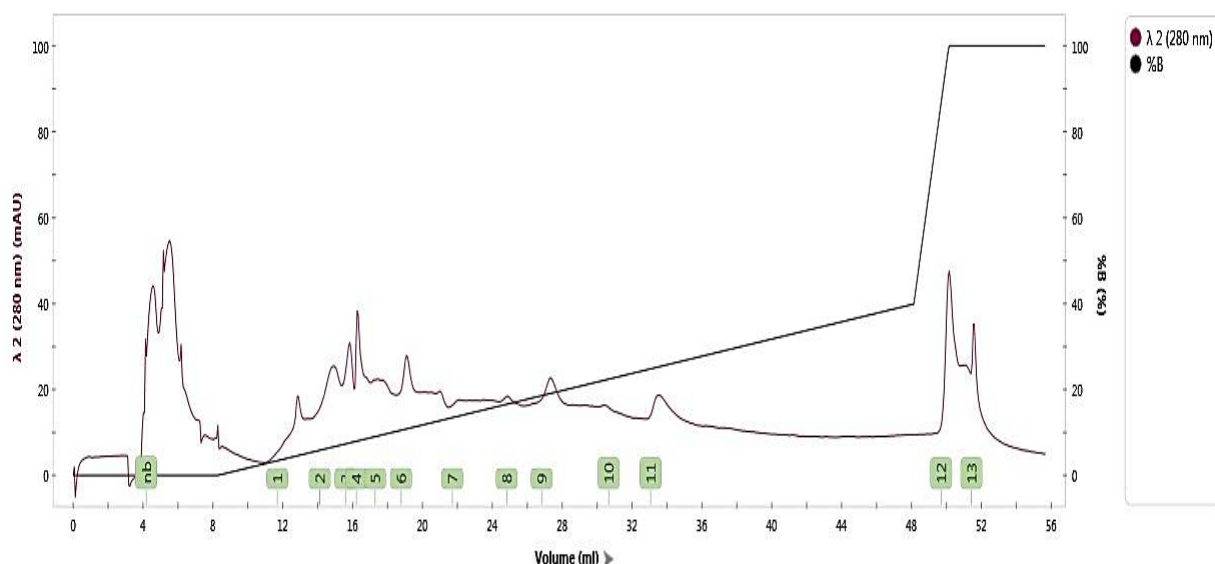


Рисунок 23 – Хроматографический профиль при фракционировании ферментного препарата ПЕП-ЛАП-II на колонке с носителем Source 15Q (на хроматограмме приведены номера фракций, а также градиент концентрации NaCl)

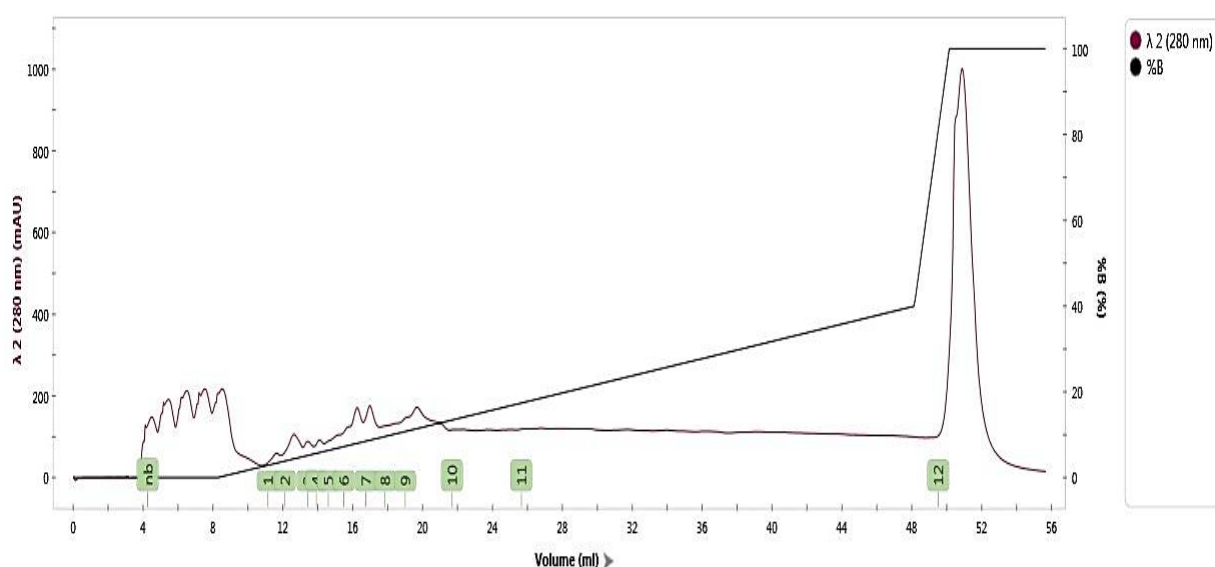


Рисунок 24 – Хроматографический профиль при фракционировании ферментного препарата Оризин на колонке с носителем Source 15Q (на хроматограмме приведены номера фракций, а также градиент концентрации NaCl)

После хроматографического разделения во фракциях был проведен анализ активности целевых ферментов, фракции также были проанализированы с помощью ДДС-ЭФ. На рисунках 25–27 представлены электрофореграммы фракций с идентификацией качественного состава ФП.

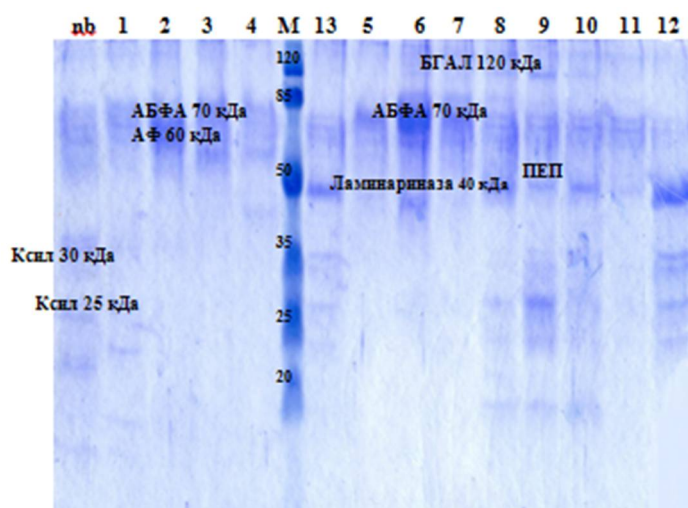


Рисунок 25 – Электрофореграмма фракций после анионообменной хроматографии ферментного препарата ПЕП, М-белковые маркеры.

Фракции сконцентрированы в 10 раз

АФ 60 кДа – α -L-арабинофуранозидаза

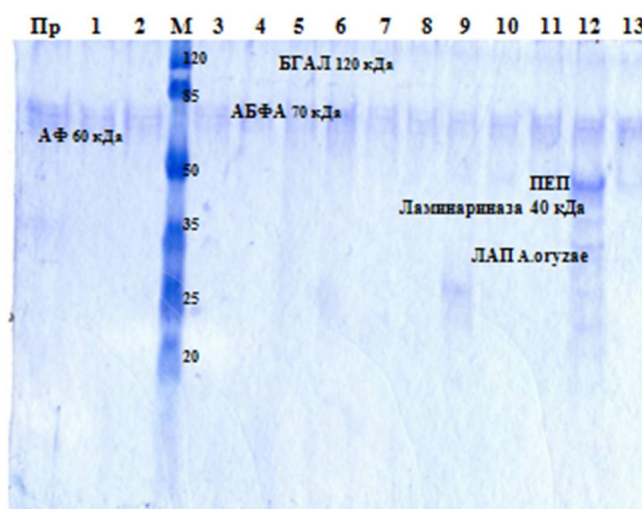


Рисунок 26 – Электрофореграмма фракций после анионообменной хроматографии ферментного препарата ПЕП-ЛАП-П, М-белковые маркеры.

Фракции сконцентрированы в 20 раз

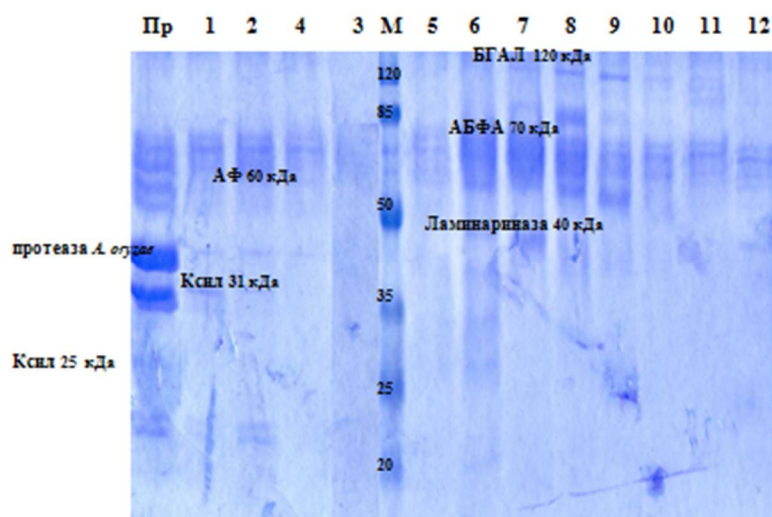


Рисунок 27 – Электрофореграмма фракций после анионообменной хроматографии ферментного препарата Оризин, М-белковые маркеры.

Фракции сконцентрированы в 10 раз.

В таблице 26 представлен состав новых комплексных ФП, а также состав контрольного ФП на основе штамма *P.canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻, полученного и исследованного ранее. Качественный состав компонентов новых ФП определяли, сопоставляя полученные электрофоретические данные по молекулярной массе ферментов в хроматографических фракциях и результаты измерения в них активностей по отношению к различным специфическим субстратам. Исходя из объёма фракций, концентрации белка в них, сопоставляя активности во фракциях по отношению к различным субстратам с удельными активностями соответствующих ферментов, рассчитывали количественный состав ФП. Кроме того, относительное содержание различных белков во фракциях определяли с помощью программы «GelAnalyzer».

Все исследованные ФП характеризовались высоким содержанием соответствующих протеаз (ПЕП *P. canescens* 43 кДа, ЛАП *A. oryzae* 37 кДа и сериновой протеазы *A. oryzae* – 37 кДа) – в зависимости от препарата содержание этих ферментов составляло 20–25 % от общего пула белка. Помимо этого, ФП характеризовались относительно высоким содержанием ксиланаз (30 и 25 кДа) – оно варьировало от 18 до 20% от общего пула белка. Кроме того, ФП содержали

25–30% α -L-арабинофуранозидазы 60 кДа (АФ) и АБФА 70 кДа, а также около 2–5% β -1,3-глюканазы (БГЛ).

Таблица 26 – Компонентный состав ферментных препаратов

ФП	Содержание компонентов ферментного препарата, % от общего количества белка				
	Ксиланазы	АФ, АБФА	БГЛ	Протеазы	Другие ферменты
Контроль niaD ⁻	47	35	2–5	<1	9–15
ПЕП-П	20 (мажор – 30 кДа, минор – 25 кДа)	35	2–5	23 (ПЕП)	17–20
ПЕП-ЛАП-П	18 (мажор – 30 кДа, минор – 25 кДа)	25	2–5	20 (ПЕП – 16, ЛАП – 4)	32–35
Оризин	15–20* (мажор – 30 кДа, минор – 25 кДа)	30	2	25–30* (сериновая протеаза)	13–28

*Сериновая протеаза *A. oryzae* фрагментируется на 2 полосы 37 кДа и 25 кДа. Полоса на фореze (25 кДа) соответствует 2 белкам – ксиланазе *P. canescens* и сериновой протеазе *A. oryzae*.

Таким образом, исследованные ФП характеризовались высоким содержанием рекомбинантных целевых ферментов протеолитического действия, а также наличием в их составе комплекса гемицеллюлаз, обладающих активностью по отношению к НКП – ксиланаз, АФ, АБФА, БГЛ.

3.5 Прикладные испытания новых ферментных препаратов, полученных с помощью рекомбинантных штаммов

3.5.1 Исследование эффективности применения ферментного препарата пенициллопепсина и лейцинаминопептидазы для интенсификации спиртового брожения

Применение протеолитического ферментного комплекса в спиртовом брожении способствует более полному гидролизу крахмала и белковых компонентов сырья, так как в зерновом сырье крахмальные зерна пронизаны белковыми веществами [55, 56]. Целесообразно использовать протеолитические ФП как эндо-, так и экзодействия. В результате применения эндопротеаз образуются пептиды различной молекулярной массы. Экзопептидазы гидролизуют белок и пептиды до коротких пептидов и аминокислот. Совместное использование протеаз позволяет получать сусло, обогащенное легко ассимилируемым аминным азотом аминокислот, который является источником питания дрожжей, что способствует повышению плотности дрожжевой популяции, бродильной способности и продуктивности клеток [6].

В исследованиях по интенсификации спиртового брожения использовали комплексный ФП ПЕП-ЛАП (раздел 3.2.2), содержащий кислую протеазу и лейцинаминопептидазу. Для сравнения использовали коммерческий ФП Protoferm FP (Shandong Longda Bio-Products Co., Ltd., Китай), который широко применяется в спиртовой промышленности для улучшения показателей сбраживаемого сусла. ФП Protoferm FP представляет собой препарат кислой грибной протеазы штамма *A. niger*. Активность протеаз ФП представлена в таблице 27.

Таблица 27 – Протеолитические активности ферментных препаратов, участвующих в спиртовом брожении

ФП	ПС, ед./г <i>pH 4,7, 30 °C</i> <i>гемоглобин</i>	ЛАПА, ед./г <i>pH 5,0, 30 °C</i>
Protoferm FP	800±60	0
ПЕП-ЛАП-Л	1588±132	550±35

В качестве фермента разжижающего действия использовали ФП бактериальной термостабильной α -амилазы Liqueflow («Novozymes A/S», Дания), в качестве осахаривающего фермента – ФП глюкоамилазы SAN Super 360L («Novozymes A/S», Дания).

Эффективность применения ФП ПЕП-ЛАП в спиртовом брожении определяли методом постановки бродильных проб по схеме, представленной в таблице 28.

Таблица 28 – План постановки бродильных проб

Вариант	Тепловая обработка замеса <i>1,5 ч при 80°C</i> <i>2 ч при 85–88°C</i>	Осахаривание <i>1 ч при 58°C</i>	Брожение <i>68 ч при 34–35°C</i>
1 контроль	+0,6 ед. АС/г крахм.	+6 ед. ГлС/г крахм.	–
2	+0,6 ед. АС/г крахм.	+6 ед. ГлС/г крахм. +0,1 ед. ПС/г сырья ФП Protoferm	-
3	+0,6 ед. АС/г крахм.	+6 ед. ГлС/г крахм.	+0,1 ед. ПС/г сырья ФП Protoferm
4	+0,6 ед. АС/г крахм.	+6 ед. ГлС/г крахм. +0,1 ед. ПС/г сырья ФП ПЕП-ЛАП	-
5	+0,6 ед. АС/г крахм.	+6 ед. ГлС/г крахм.	+0,1 ед. ПС/г сырья ФП ПЕП- ЛАП

Пшеничную муку (крахмалистость 57,7%) смешивали с теплой водой (50–55°C) в соотношении 1:3. В контрольные и опытные колбы вносили раствор ФП термостабильной α -амилазой из расчета 0,6 ед. АС/г крахмала, поднимали температуру до 80°C и выдерживали замесы при этой температуре 1,5 часа. Далее температуру поднимали до 85–88°C и выдерживали 2 часа, после этого охлаждали до 60°C. После этого сусло осахаривали при температуре $59 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 1 часа. Для осахаривания в колбы с разваренной массой вносили глюкоамилазу из расчета 6 ед. ГлС/г крахмала; в опытные колбы (в случае вариантов 2 и 4) вносили ФП протеаз из расчета 0,1 ед. ПС/г сырья. После осахаривания сусла и охлаждения его до 34–35°C в опытные колбы (в случае вариантов 3 и 5) вносили ФП протеаз из расчета 0,1 ед. ПС/г. Далее в колбы вносили отмытые дрожжи (*S.*

cerevisiae 985T) в количестве 10% к объему сусла. Время брожения составило 68 часов. Анализ основных показателей процесса сбраживания пшеничного сусла (выделение CO₂, количество дрожжевых клеток, концентрации несброженных углеводов) проводили ежедневно. Основные результаты анализов представлены в таблице 29.

Полученные результаты (таблица 29) показали, что обработка пшеничного сусла ФП протеаз, как на стадии осахаривания, так и на стадии брожения, позволила существенно интенсифицировать процесс по сравнению с контролем, о чем свидетельствуют основные показатели бражки (выделение CO₂, количество дрожжевых клеток, концентрации несброженных углеводов и выход спирта).

Низкие значения содержания несброженных углеводов в опытных вариантах свидетельствуют о том, что применение ФП протеолитического действия позволило получить более глубоко выброженную бражку и увеличить выход спирта примерно на 1,13% об. по сравнению с контрольным вариантом (без ФП протеаз).

При сравнении ФП ПЕП-ЛАП и ФП Protoferm FP можно заключить, что: 1) использование ФП ПЕП-ЛАП, как на стадии осахаривания, так и на стадии брожения сусла, позволило интенсифицировать процесс дрожжегенерации на начальных его этапах. Так, после 20 ч сбраживания количество CO₂, выделенное клетками дрожжей было выше, чем в варианте с ФП Protoferm FP на 18 и 9%, соответственно, после 44 ч сбраживания сусла это преимущество составило 11 и 3%, соответственно. По окончании процесса брожения (68 ч) показатели по выделению CO₂, при использовании обоих ФП практически сравнялись; 2) выход спирта при добавлении исследуемых ФП протеаз на стадии брожения был одинаков и составил 67,2, что на 7 Дал больше, чем в контрольном варианте без использования протеаз.

Таблица 29 – Показатели сбраживания пшеничного сусла дрожжами *S. cerevisiae* 985T с использованием ферментных препаратов Protoferm FP и ПЕП-ЛАП

Вариант	ФП	Выделение CO ₂ , см ³			Дрожжи млн/см ³ /‰почк.	Концентрация несброженных углеводов, г/100 см ³				V, % спирт	Выход спирта из 1 т крахмала	Выход спирта из 1 т сырья
						C _{р.у} 44 ч	68ч					
		20 ч	44 ч	68 ч			C _{р.у} *	C _{общ} **	C _{кр} ***			
Контроль 1	АС терм. + ГЛС	5,2	9,1	12,9	69/10% почк.	5,1	1,8	1,9	0,1	9,87	60,2	34,7
2	АС терм. + ГЛС + Protoferm FP <i>На стадии осахаривания</i>	6,3	12,3	15,1	82/12%	3,3	0,45	0,5	0,05	11,06	66,6	38,4
3	АС терм. + ГЛС + Protoferm FP <i>На стадии брожения</i>	7,6	14,4	15,1	84/14%	0,85	0,4	0,46	0,06	11,1	67,2	38,8
4	АС терм. + ГЛС + ПЕП-ЛАП <i>На стадии осахаривания</i>	7,4	13,7	15,1	76/12%	1,1	0,48	0,49	0,01	10,95	66,9	38,6
5	АС терм. + ГЛС + ПЕП-ЛАП <i>На стадии брожения</i>	8,25	14,8	15,2	81/9%	0,68	0,41	0,44	0,03	11,16	67,2	38,8

*C_{р.у} — массовая концентрация растворимых несброженных углеводов (моно-, ди-, олигосахариды);

**C_{общ} — массовая концентрация общих несброженных углеводов;

***C_{кр} — нерастворенный крахмал, определяется по разности C_{кр} = 0,9(C_{общ} - C_{р.у}) [136].

Таким образом, ФП ПЕП-ЛАП, полученный на основе нового рекомбинантного штамма *P. canescens* RN3-11-7-7, может выступать в качестве более дешевого аналога импортному ФП Protoferm FP. Применение препарата ПЕП-ЛАП в спиртовом производстве позволит существенно сократить продолжительность брожения за счет ускорения процесса на первоначальной стадии, а наличие ксиланазы будет способствовать улучшению реологических свойств суслу, снижая его вязкость. Использование нового комплексного ФП позволит снизить расходы на производство и обеспечить безопасную эксплуатацию оборудования.

3.5.2 Результаты испытаний *in vitro* ферментного препарата

Пенициллопепсина в качестве кормовой добавки на зерновом сырье

Для оценки способности ферментов к увеличению питательной ценности кормов используется “кормовой” тест *in vitro* [138]. Данный тест основан на регистрации образования ВС и растворимого белка в ходе гидролиза природных кормов.

Для оценки эффективности ФП ПЕП-Р (раздел 3.2.1) было выбрано зерновое сырье, которое наиболее часто применяемого в кормопроизводстве для кормления моногастричных животных: ржи, пшеницы и тритикале, а также зерновой послеспиртовой барды. На российском рынке не существует точного аналога комплексному ФП ПЕП-Р, поэтому в качестве сравнения выбраны моноферментные коммерческие препараты ксиланазы и кислой протеазы, которые в настоящее время широко используются в кормовой промышленности. ФП ксиланазы – Палпфор 2, продуцентом является *P. canescens* (ООО «Микробиопром», Москва) и ФП кислой протеазы – Acid Protease, продуцентом является *A. niger* (Beijing Challenge Biotechnology Ltd Co., Китай). Характеристики данных ФП представлены в таблице 30.

Гидролиз сырья проводили в пластиковых микропробирках объемом 2 см³ при 40°C при постоянном перемешивании. Концентрация сырья составляла 50

мг/см³ по сухой массе, ФП вносили в дозировке 6 мг ФП/г сырья. Через 3 ч инкубирования полученные гидролизаты центрифугировали при 10750 g в течение 5 мин. В супернатантах определяли содержание растворимого белка и ВС.

Таблица 30 – Характеристика ферментных препаратов для гидролиза зерновых субстратов

ФП	Белок	ПС <i>pH 4,7, 30°C</i> <i>гемоглобин</i>	КсА <i>pH 5,0, 50°C</i>	БГЛ <i>pH 5,0, 50°C</i>
ПЕП-Р	156±12	650±80	1220±90	97±5
Палпфор 2	133±15	< 0,1	1250±120	24±1
Acid Protease	168±13	670±60	< 0,1	< 0,1

В экспериментах использовали сырьё с высоким содержанием арабиноксилана – пшеницу, рожь, тритикале, являющиеся основой рационов для моногастричных сельскохозяйственных животных и птицы, а также послеспиртовую барду. Эффективность совместного действия основных компонентов комплексного ФП ПЕП-Р на полимеры зерновых субстратов оценивали в сравнении с коммерческими препаратами ксиланазы – Палпфор 2 и кислой протеазы – Acid Protease, используемыми в кормопроизводстве.

Полученные результаты (рисунок 28), свидетельствуют о существенном увеличении выхода растворимого белка и ВС после гидролиза субстратов всеми исследуемыми ФП. Максимальную эффективность при гидролизе ржи, тритикале и пшеницы проявил ФП ПЕП-Р, очевидно, за счет наличия у него как протеазной, так и гемицеллюлазной видов активностей. По сравнению с контролем (без воздействия ферментов) применение ПЕП-Р позволило увеличить выход растворимого белка на 29% (рожь, тритикале) и на 108% (пшеница), выход ВС увеличился на 111% и 125% на пшенице и тритикале, соответственно, и на 160% – на ржи. Менее эффективными были коммерческие ФП: по сравнению с контролем применение ксиланазного ФП Палпфор-2 приводило к увеличению выхода водорастворимого белка только на 10% (рожь, тритикале, пшеница); выход ВС увеличивался на 78 и 63% на пшенице и тритикале, соответственно, и на 110% –

на ржи. Протеазный ФП Acid Protease был более эффективен, чем Палпфор-2, но все же проигрывал комплексному ФП ПЕП-Р: применение ФП Acid Protease приводило к увеличению выхода водорастворимого белка примерно на 16% (рожь, тритикале) и на 92% на пшенице; выход ВС увеличивался на 89% и 38% на пшенице и тритикале, соответственно, и на 120% – на ржи.

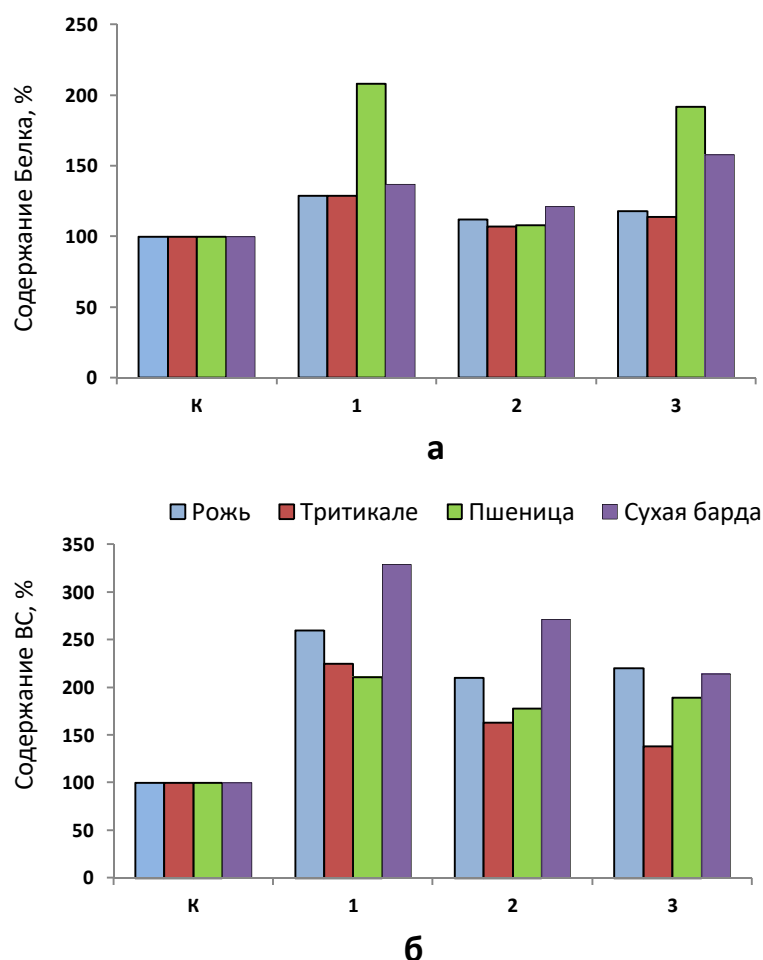


Рисунок 28 – Выход водорастворимого белка (а) и восстанавливающих сахаров (б) при обработке различных видов зерна ферментными препаратами: ПЕП-Р – 1; Палпфор-2 – 2; Acid Protease – 3.
К – контроль, без ФП

Таким образом, при использовании пшеницы (сырья с относительно высоким содержанием белка) в результате действия ПЕП-Р наиболее выраженным было увеличение выхода водорастворимого белка за счёт проявления активности протеазы, а при использовании ржи (сырья с

относительно высоким содержанием НКП) использование ПЕП-Р привело к существенному увеличению выхода ВС вследствие проявления активности комплекса.

ФП ПЕП-Р был эффективен и при воздействии на послеспиртовую барду – увеличение выхода водорастворимого белка составило 37% по отношению к контролю, а ВС на 229%. При использовании ФП кислой протеазы Acid Protease содержание водорастворимого белка повысилось на 58%, а ВС на 114%. Применение ФП ксиланазы Палпфором 2 привело к увеличению ВС на 171%, а белка на 21%. Увеличенный выход водорастворимого белка при применении ФП Acid Protease возможно связан с более высокой активностью ФП Acid Protease при pH 4,0 (естественный pH суспензии сухой послеспиртовой барды в концентрации 50 мг/см³) по сравнению с ПЕП-Р.

Таким образом, в опытах *in vitro* комплексный ФП ПЕП-Р, полученный на основе нового рекомбинантного штамма *P. canescens* *Pep-4*, обладающий как протеазной, так и гемицеллюлазной активностями, эффективно гидролизует белки и НКП зернового сырья, а также зерновой послеспиртовой барды, обеспечивая существенное увеличение выхода водорастворимых белка и сахаров. Наличие в препарате протеаз и гемицеллюлаз (в первую очередь – ксиланаз) обусловило более высокую эффективность использования ФП ПЕП-Р при воздействии на зерновое сырьё по сравнению с ФП, обладающих каким-либо одним видом активности – только протеазной или только ксиланазной. Проведенные исследования показали целесообразность применения ФП ПЕП в качестве кормовой добавки при использовании кормов на основе зерновых культур.

3.5.3 Результаты испытаний *in vitro* ферментных препаратов сериновой протеазы *P. canescens* в качестве кормовой добавки на соевом сырье

Соя, в частности соевый шрот, образующийся при получении соевого масла, является перспективным источником полноценного по а.к. составу белка для

кормовых и пищевых целей. Однако компактная структура нативных белков сои и наличие дисульфидных связей делает их трудногидролизуемой белковой субстанцией [139, 140], что отрицательно влияет на процессы пищеварения.

По литературным данным известно, что высокой гидролитической способностью в отношении белоксодержащих субстратов характеризуются ФП сериновых протеаз, которые способны к расщеплению трудногидролизуемых белков [141, 142]. Ферментативная обработка сериновыми протеазами способствует повышению питательной ценности и снижению аллергенности белков [143].

Для оценки эффективности воздействия ФП на соевые белки были проведены эксперименты по ферментативной обработке соевых субстратов (соевой муки и соевого шрота) – “кормовые” тесты *in vitro* [138]. Были исследованы ФП сериновой протеазы – Оризин и комплексный ФП МЭК, содержащий сериновую и кислую протеазы (полученных с помощью различных штаммов *P. canescens*, раздел 3.2.3). В таблице 31 приведены характеристики используемых ФП.

Таблица 31 – Содержание белка (мг/г) и активности (ед./г) ферментных препаратов ПЕП-А, Оризин-А и МЭК-А

ФП	Белок	ПС		КсА, <i>pH</i> 5,0, 50°C	БГЛ <i>pH</i> 5,0, 50°C
		<i>pH</i> 4,7, 30°C гемоглобин	<i>pH</i> 10,0, 40°C казеинат натрия		
ПЕП-А	270±20	1500±100	-	730±60	170±10
Оризин-А	300±20	-	340±20	4000±250	160±10
МЭК-А ПЕП-А+Оризин-А в соотношении 1:1	280±20	870±60	170±10	3140±220	160±10

Гидролиз соевой муки и соевого шрота проводили в пластиковых микропробирках объемом 2 см³ при 40°C при постоянном перемешивании. Концентрация субстрата составляла 50 мг/см³ по сухой массе, ФП вносили в

дозировке 6 мг ФП/г сырья. Через 3 ч гидролиза ферменты инактивировали инкубированием при 90°C в течение 5 мин.

Эффективность гидролиза оценивали по изменению концентрации растворимого белка и ВС в супернатанте, и по исчезновению полос высокомолекулярных белковых фракций на электрофореграммах, характеризующих осадок (см. ниже).

Нерастворимую часть сырья отделяли центрифугированием при 10750 g в течение 5 мин, высушивали при 60°C в течение 4 ч и использовали для качественной оценки результатов воздействия ФП с помощью ДДС-ЭФ. Для проведения электрофореза нерастворимой части проводили пробоподготовку. Для этого высушенный осадок смешивали с SDS-буфером и инкубировали при постоянном перемешивании в течение 1 ч при комнатной температуре, далее центрифугировали при 10750 g в течение 1 мин и проводили ДДС-ЭФ полученной надосадочной жидкости.

Результаты представлены на рисунках 29 и 30.

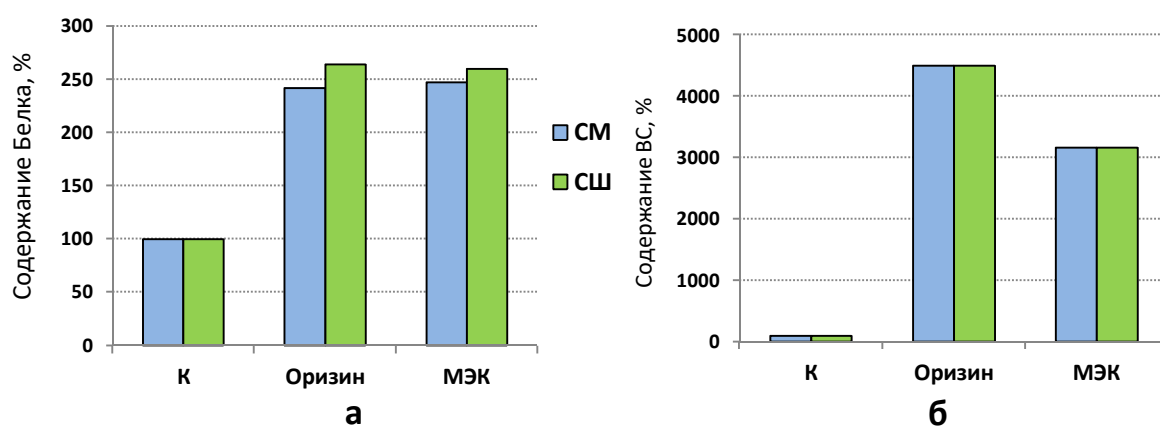


Рисунок 29 – Выход водорастворимого белка (а) и восстанавливающих сахаров (б) при обработке соевой муки (СМ) и соевого шрота (СШ) ферментными препаратами Оризин и МЭК. К – контроль, без ФП

В результате обработки соевой муки и шрота ФП, содержащими сериновую протеазу (Оризин и МЭК), концентрация водорастворимого белка относительно

контроля увеличилась в 2,4–2,6 раз, ВС – в 45 и 32 раза, соответственно (рисунок 29).

Практически одинаковый выход растворимого белка при обработке соевой муки и шрота двумя ФП, различающимися по составу (один имел в своём составе сериновую и кислую протеазы, другой – только сериновую), свидетельствует о том, что основным ферментом, способным гидролизовать соевые продукты, является сериновая протеаза, кислая же протеаза в этом процессе не участвует.

Увеличение концентрации ВС при использовании ФП Оризин по сравнению с МЭК обусловлено более высокой активностью сериновой протеазы первого, и, следовательно, более интенсивному гидролизу белкового комплекса сои вследствие чего разрушаются углеводно-протеиновые связи, и, в конечном итоге, увеличивается выход ВС в раствор.

Результаты качественной оценки состава гидролизатов с помощью ДДС-ЭФ подтверждают высокую эффективность применения для обработки соевой муки и шрота ФП, содержащих сериновую протеазу (рисунок 30). На электрофореграммах гидролизатов соевых продуктов ФП Оризин и МЭК наблюдали снижение содержания белков с высокой молекулярной массой и повышение содержания белковых фракций с молекулярной массой ниже 25 кДа.

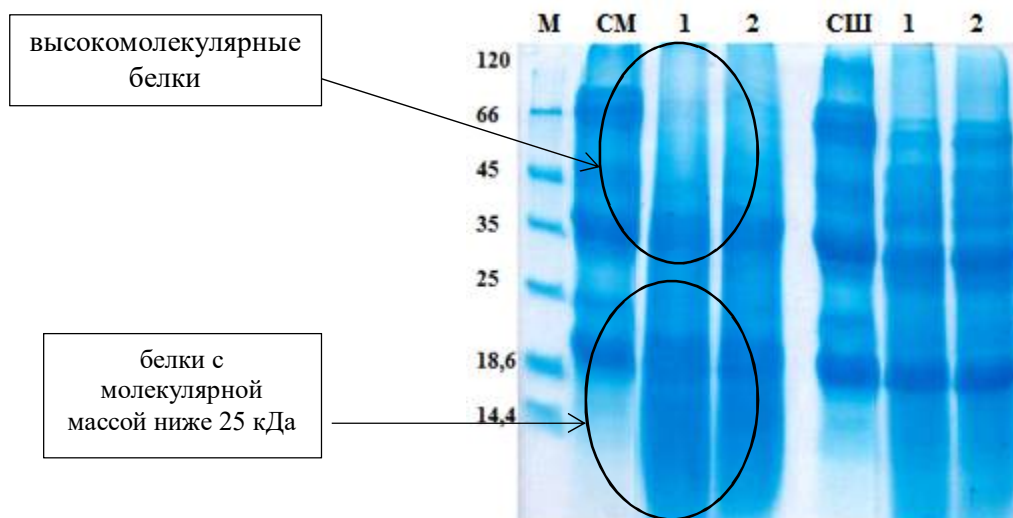


Рисунок 30 – Электрофореграмма нерастворимой части образцов соевой муки (СМ), соевого шрота (СШ) и их гидролизатов протеолитическими препаратами:

1 – Оризин; 2 – МЭК

Таким образом, полученные в опытах *in vitro* результаты показали эффективность применения ФП сериновой протеазы (на примере ФП Оризин-А и МЭК-А) при гидролизе белков сои. При этом было установлено, что наличие или отсутствие кислой протеазы в составе ферментного комплекса не играет заметной роли с точки зрения влияния на эффективность воздействия на белки сои. Очевидно, более целесообразно использовать комплекс сериновой и кислой протеаз (смесь ФП Оризин и ПЕП) на смешанном сырье, содержащем зерновое и соевое сырьё. Результаты исследования эффективности применения ФП протеаз на смешанном сырье представлены ниже в опытах *in vivo* (глава 3.5.4).

3.5.4 Результаты испытаний *in vivo* комплексных ферментных препаратов по влиянию на продуктивность и физиологическое состояние свиней при откорме

Проведены испытания *in vivo* по влиянию мультиферментных препаратов протеолитического действия на продуктивность и физиологическое состояние свиней при откорме на племзаводе «Орловский» Тамбовской области.

В опытах использовали промышленные ФП ПЕП-П и МЭК-П, полученные в производственных условиях на заводе ООО «Агрофермент». В таблице 32 приведены характеристики используемых ФП.

Таблица 32 – Содержание белка (мг/г) и активности (ед./г) ферментных препаратов ПЕП-П и МЭК-П, полученных в производственных условиях и использованных для испытаний по кормлению свиней

ФП	Белок	ПС по HUT <i>pH 4,7, 30°C</i> гемоглобин	ПС по ФОЛП, <i>pH 10,5, 40°C</i> казеин по Гаммерстену	КсА, <i>pH 5,0, 50°C</i>	БГЛ, <i>pH 5,0, 50°C</i>
ПЕП-П, гранулированный, на основе штамма <i>P. canescens Pep-4</i>	65±4	133000±6500	-	1080±50	110±6

ФП	Белок	ПС по НУТ <i>pH 4,7, 30°C</i> <i>гемоглобин</i>	ПС по ФОЛП, <i>pH 10,5, 40°C</i> <i>казеин по</i> <i>Гаммерстену</i>	КсА, <i>pH 5,0, 50°C</i>	БГЛ, <i>pH 5,0, 50°C</i>
Оризин-П, гранулированный на основе штамма <i>P. canescens</i> <i>Oryzin-25</i>	72±4	-	3400±150	960±40	220±10
МЭК-П (ПЕП+Оризин, в соотношении 1:1,5)	70±4	51000±2000	1020±50	840±40	160±8

Для проведения опытов *in vivo* по принципу аналогов (порода, возраст, живая масса) было сформировано 4 группы молодняка свиней крупной белой породы; одна группа была контрольная и не получала ФП в составе комбикорма, остальные три группы получали ФП (таблица 33). Каждая группа состояла из 10 голов со средней живой поросят 55 кг на 1 голову. Продолжительность кормления составила 90 кормодней. Все животные были обеспечены одинаковыми условиями содержания.

Таблица 33 – Схема откорма свиней

№ №	Группа	Кол-во животны х	Живая масса при постановке, кг	Продолжительно сть, кормодни	Условия кормления
1	Контрольная	10	55	90	Основной рацион
2	Опытная	10	55	90	Основной рацион +200 г/т ФП ПЕП-П
3	Опытная	10	55	90	Основной рацион +500 г/т ФП ПЕП-П
4	Опытная	10	55	90	Основной рацион +200 г/т МЭК-П (ПЕП+Оризин, в соотношении 1,5:1)

Основным рационом кормления животных был сухой комбикорм из смешанного сырья (таблица 34), содержащий в качестве основных компонентов ячмень, пшеницу и горох, кормление осуществлялось два раза в сутки по принятому на ферме распорядку дня (потребление воды не ограничено). Опытные

партии комбикормов изготавливали в кормоцехе хозяйства на комбикормовом оборудовании «Доза».

Таблица 34 – Рецепттура комбикорма

Компоненты	Содержание, %
Ячмень	35,0
Пшеница	35,0
Горох	15,0
Жмых подсолнечный	12,0
Фосфат кормовой обесфторен.	1,0
Мел кормовой	0,8
Премикс	1,0
Асид-Лак	0,1
Био-мос	0,1

В ходе опыта проводили наблюдения за потреблением кормов, поведением и физиологическим состоянием животных, изучали также энергию роста подопытного молодняка, среднесуточные приросты и конверсию кормов.

Для оценки качества получаемой свиноводческой продукции был проведен комплекс исследований с изучением показателей, характеризующих качество мяса и шпика, а также состояние внутренних органов.

На основании проведенных исследований сделаны следующие выводы:

1. Включение в комбикорма ФП ПЕП-П и МЭК-П оказало положительное влияние на продуктивность, физиологические процессы, клиническое состояние животных, пищеварение, развитие внутренних органов и мясные качества откормочного молодняка свиней.

2. При использовании ФП ПЕП-П в дозировке 200 г/т и 500 г/т среднесуточные приросты живой массы у свиней увеличились на 44 г и 61 г или на 7,2 и 10,0%, соответственно. При использовании МЭК-П в дозировке 200 г/т среднесуточный прирост живой массы увеличился на 55 г или 9,0 %. Это свидетельствует о лучшем усвоении корма у животных, получавших в рационе ФП, за счет совместного действия комплекса протеаз и ксиланазы.

3. Показатели мясной продуктивности у свиней, получавших в рационах ферментные препараты, были выше по убойному выходу туш на 0,6–1,2 %.

4. Толщина шпика на уровне 6–7 грудного позвонка была меньше в опытных группах, получавших кормовые добавки, в обоих рационах на 2,0 и 1,5 мм, а площадь «мышечного глазка» увеличилась соответственно на 0,8 и 1,5 см². Данные показатели соответствуют нормам беконного откорма свиней (требования ГОСТа Р 5322 – 2008 – Свиньи для убоя).

5. Свинина опытных и контрольных групп имела признаки свинины, отвечающие стандартам NOR (Группа качества мяса – нормальное мясо или мясо с нормальной пищевой ценностью) по показателям pH, влагосвязывающей способности и интенсивности окраски мяса.

6. Анализ химического состава мяса и шпика подопытных животных показал высокую пищевую ценность. В мясе содержалось 4,00–4,27% жира, 21,96–22,32 % белка, а в шпике 90,32–90,48 % жира и от 3,17 до 3,35 % белка. Эти показатели отвечают товарным и вкусовым качествам мяса и характеризуют высокую энергетическую ценность шпика.

3.5.4.1 Расчет экономической эффективности производства свинины с использованием новых ферментных препаратов в составе комбикормов

Одной из основных задач данных испытаний являлся анализ экономической эффективности использования ФП ПЕП-П и МЭК-П в кормлении свиней.

На основе результатов научно-производственного опыта была рассчитана экономическая эффективность ФП в составе комбикормов и кормовых добавок (таблица 35, в ценах 2016 г.).

При расчёте экономической эффективности производства свинины использовали данные по приросту живой массы, полученной за период опыта (90 кормодней), которая составила соответственно по группам 54,8; 58,8; 60,2; 59,8 кг; стоимость 1 кг живой массы 140 руб.; стоимость ФП ПЕП-П и МЭК-П по 1000

руб./кг. Результаты расчётов экономической эффективности показывают, что при увеличении затрат на ФП ПЕП-П при кормлении во 2-ой опытной группе на 72 руб. было дополнительно получено 4 кг прироста живой массы, выручка от реализации дополнительно полученной живой массы составила 488 руб. на голову по сравнению с контрольной группой. При увеличенной дозировке ФП ПЕП-П в 3-ей опытной группе дополнительный доход составил 576 руб. на голову; при использовании ФП МЭК-П в 4-ой опытной группе получен дополнительный доход в сумме 628 руб. на голову.

Таблица 35 – Экономическая эффективность использования ферментных препаратов ПЕП-П и МЭК-П на 1 голову за 90-дневный период откорма свиней

Показатели	Группа			
	1 – контрольная	2 – опытная	3 – опытная	4 – опытная
Живая масса в начале периода, кг	54,7	54,6	55,1	55,0
Живая масса в конце периода, кг	109,5	113,4	115,3	114,8
Прирост живой массы, кг	54,8	58,8	60,2	59,8
Дополнительный прирост на 1 гол., кг	-	4,0	5,4	5,0
Стоимость 1 кг живой массы, руб.	140	140	140	140
Стоимость прироста дополнительной живой массы, руб.	-	560	756	700
Количество израсходованного комбикорма, кг	360	360	360	360
Количество израсходованного препарата, г на 1 гол.	-	72	180	72
Стоимость 1 кг препарата, руб.	-	1000	1000	1000
Стоимость израсходованного препарата, руб.	-	72	180	72
Получен дополнительный доход на 1 гол., руб.	-	488	576	628

Таким образом, исследования показали, что внесение ФП ПЕП-П и МЭК-П в комбикорма повышало доступность и переваримость питательных веществ корма; способствовало нормализации микрофлоры кишечника за счёт снижения количества непереваренного белка; повышало продуктивность животных; улучшало экономические показатели, что открывает перспективу для широкого

использования новых ФП в качестве новой кормовой добавки в животноводстве (Приложение Г). Получен Патент РФ (Приложение Б).

ВЫВОДЫ

1. Методами генной инженерии с использованием системы экспрессии генов на основе штамма-реципиента *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻ получены стабильные высокоактивные рекомбинантные продуценты грибных протеаз с различной специфичностью действия (без существенного снижения базового уровня собственного комплекса гемицеллюлаз): *P. canescens* Pep-4 – продуцент кислой аспартатной протеазы – пенициллопепсина; *P. canescens* RN3-11-7-7 – продуцент пенициллопепсина и лейцинаминопептидазы; *P. canescens* Oryzin-25 – продуцент грибной сериновой протеазы – оризина.

2. Успешно проведены производственные испытания процесса культивирования новых рекомбинантных штаммов *P. canescens* Pep-4 и *P. canescens* RN3-11-7-7 в промышленных условиях (ООО «Агрофермент»), позволившие масштабировать технологию получения препаратов кислой аспартатной протеазы, лейцинаминопептидазы и ксиланазы и получить промышленные партии ферментных препаратов.

3. Исследован компонентный состав промышленных ферментных препаратов ПЕП (пенициллопепсина) и ПЕП-ЛАП (пенициллопепсина и лейцинаминопептидазы) и лабораторного ферментного препарата Оризина. Установлено, что содержание рекомбинантных протеаз составляет 20–25% от общего пула белка, ксиланазы – 15–20%, α -L-арабинофуранозидазы и арабиноксилан-арабинофураногидролазы – 25–30%, β -1,3-глюканы – 2–5%, что свидетельствует о наличии в составе рекомбинантных ферментных препаратов комплекса протеолитических и гемицеллюлолитических ферментов.

4. Определены pH- и температурные оптимумы действия различных ферментов, входящих в состав рекомбинантных ферментных препаратов – для пенициллопепсина они составили pH 4,0–5,0 и 50–55°C; для сериновой протеазы – pH 9,5–11,0 и 30–40°C; для лейцинаминопептидазы – pH 8,0–9,0 и 70°C; для ксиланазы – pH 3,5–4,5 и 55–65°C. Ферменты обладали высокой стабильностью при температуре 30–50°C.

5. Проведены испытания ферментного препарата ПЕП-ЛАП (пенициллопепсин и лейцинаминопептидаза) по интенсификации спиртового брожения. Показано, что обработка им пшеничного сусла на стадии сбраживания позволила существенно интенсифицировать процесс дрожжегенерации и брожения, увеличить выход спирта на 1,29%.

6. Проведены испытания *in vivo* влияния мультиферментных препаратов (ПЕП и ПЕП+Оризин) на продуктивность и физиологическое состояние свиней при откорме. Включение этих препаратов в качестве кормовой добавки в комбикорма из смешанного сырья оказало положительное влияние на продуктивность, физиологические процессы, клиническое состояние животных, пищеварение, развитие внутренних органов и качественные показатели мяса откормочного молодняка свиней.

7. Расчёт экономической эффективности производства свинины с использованием новых ферментных препаратов показал (в ценах 2016 г.), что при увеличении на 1 голову живой массы свиней от 55 до 110–115 кг получен дополнительный доход в размере 488 рублей (дозировка ПЕП 200 г/т); 576 рублей (дозировка ПЕП 500 г/т) и 628 рублей (дозировка МЭК 200 г/т).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а.к. – аминокислоты (аминокислотная)

а.о. – аминокислотные остатки

АБФА – арабинофуранозидаса А, арабиноксилан-фураногидралаза А (70 кДа)

АФ – α -L-арабинофуранозидаса (60 кДа)

АПК – агропромышленный комплекс

АС – амилолитическая активность

БГАЛ – β -галактозидаза

БГЛ – β -1,3-глюканаза

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВКМ – всероссийская коллекция микроорганизмов

ВПМ – вегетативный посевной материал

ВС – восстанавливающие сахара

ГлС – глюкоамилазная активность

ДДС-ЭФ – электрофореза в денатурирующих условиях

КЖ – культуральная жидкость

КсА – ксиланазная активность

КсилА – эндо-1,4- β -ксиланаза (ксиланаза А)

ЛАП – лейцинаминопептидаза

ЛАПА – лейцинаминопептидазная активность

МЭК – мультиэнзимная композиция

НГ – нитрозогуанидин

НКП – некрахмальные полисахариды

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЕП – пенициллопепсин

ПС – протеолитическая активность

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РМ – минимальная агаризованная среда для отбора трансформантов

СМ – соевая мука

СШ – соевый шрот

ТХУ – трихлоруксусная кислота

УК – ультраконцентрат

УФ – ультрафиолет

ФМСФ – фенилметансульфонилфторид

ФП – ферментный(ые) препарат(ы)

ЦГ – целевой ген

abfa – ген арабиноксилан-фураногидролазы А

alp – ген оризина

amp – ген устойчивости к ампициллину

bga – ген β -галактозидазы

lap1 – ген лейцинаминопептидазы

niaD – ген нитратредуктазы

perA – ген пенициллопепсина

xlnR – ген транскрипционного активатора ксиланазы

xy1A – ген эндо-1,4- β -ксиланазы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Стратегия развития пищевой и перерабатывающей промышленности Российской Федерации на период до 2020 года [Электронный ресурс]: распоряжение правительству РФ от 17.04.2012 № 559-р, ред. от 30.06.2016 № 1378-р. – Режим доступа: URL: <http://static.government.ru/media/files/65bZISIOP6bA0VSJ67GnnpKIhhoHhxgP.pdf> (14.01.2019)
2. Ward O.P. Proteases, production // Encyclopedia of Microbiology / O.P. Ward, M.B. Rao, A. Kulkarni; edited by M. Schaechter. – Third edition. – 2009. – P. 495–511.
3. Rao M.B. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases / M.B. Rao, A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, V.V. Deshpande // Microbiol. and Mol. Biol. Rev. – 1998. – V. 62(3). – P. 597–635.
4. Mamo J. The role of microbial aspartic protease enzyme in food and beverage industries / J. Mamo, F. Assefa // Journal of Food Quality. – 2018. – V. 2018. – 15 p.
5. Серба Е.М. Биотехнологические основы ресурсосберегающей переработки зернового сырья и вторичных биоресурсов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.01.06 / Серба Елена Михайловна. – Щёлково, 2015. – 51 с.
6. Римарева Л.В. Роль протеаз в спиртовом брожении / Л.В. Римарева, М.Б. Оверченко // III Международный научно-практический симпозиум «Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК», 27 апреля 2006, Москва. – С. 127–137.
7. Толкачева А.А. Ферменты промышленного назначения – обзор рынка ферментных препаратов и перспективы его развития / А.А. Толкачева, Д.А. Черенков, О.С. Корнеева, П.Г. Пономарев // Вестник ВГУИТ. – 2017. – Т.79, №4. – С. 197–203.

8. Гришин Д.В. Биоактивные белки и пептиды: современное состояние и новые тенденции практического применения в пищевой промышленности и кормопроизводстве / Д.В. Гришин, О.В. Подобед, Ю.А. Гладилина, М.В. Покровская, С.С. Александрова, В.С. Покровский, Н.Н. Соколов // *Вопр. Питания*. – 2017. – Т.86. – № 3. – С. 19–31.
9. Souza P.M. A biotechnology perspective of fungal proteases / P.M. Souza, M.L. Assis Bittencourt, C.C. Caprara, M. Freitas, et al. // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2015. – V. 46(2). – P. 337–346.
10. Nirmal N.P. Fungal Proteases: An Overview / N.P. Nirmal, S. Shankar, R.S. Laxman // *International Journal of Biotechnology and Biosciences*. – 2011. – V. 1(1). – P. 1–40.
11. Sinitsyn A.P. *Penicillium canescens* host as the platform for development of a new recombinant strain producers of carbohydrases // *Microorganisms in Biorefineries* / A.P. Sinitsyn, A.M. Rozhkova / Edited by B. Kamm. – Berlin: Springer-Verlag, 2015. – P. 1–19.
12. Лысенко Л.А. Протеолитическая регуляция биологических процессов / Л.А. Лысенко, Н.Н. Немова, Н.П. Канцерова. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2011. – 482 с.
13. Номенклатура ферментов: Рекомендации Международного биохимического союза по номенклатуре и классификации ферментов, символам кинетики ферментативных реакций / перевод с англ. под ред. А.Е. Браунштейна. – М.: ВИНТИ, 1979. – 322 с.
14. Rawlings N.D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database / N.D. Rawlings, A.J. Barrett, P.D. Thomas, X. Huang, A. Bateman, R.D. Finn // *Nucleic Acids Res*. – 2018. – V. 46. – P. 624–632.
15. Лаврентьева Е.В. Основы молекулярных механизмов регуляции экспрессии генов пептидаз в прокариотной клетке / Е.В. Лаврентьева, Т.Г. Банзаракцаева, А.А. Раднагуруева, Л.Б. Буянтуева / Под ред. Б.Б. Намсараева. – Улан-Удэ, 2012. – 66 с

16. Ежова Г.П. Биоинформационные аспекты протеомики и деградации белка / Г.П. Ежова, А.А. Бабаев, В.В. Новиков. – Нижний Новгород, 2007. – 86 с.
17. Gonzales T. Bacterial amino peptidase: properties and functions / T. Gonzales, J. Robert-Baudouy // FEMS Microbiol Rev. – 1996. – V. 18. – P. 319–344.
18. Strater N. Leucyl aminopeptidase (animal and plant) // Handbook of Proteolytic Enzymes / N. Strater, W.N. Lipscomb / Ed. A. Barret, N.D. Rawlings, J.F. Woessner. – NY: Academic press., 1998. – ch. 473. – P. 1384–1389.
19. Lazdunski A. Peptidases and proteases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* / A. Lazdunski // FEMS Microbiol Rev. – 1989. – V. 63. – P. 265–276.
20. Rawlings N.D. Introduction: metallopeptidases and their clans // Handbook of Proteolytic Enzymes / N.D. Rawlings, A.J. Barrett; edited by J.F. Woesner. – Second edition. – USA: Elsevier/Academic Press, 2004. – P. 231–263.
21. Rahulan R. Characterization of leucine amino peptidase from *Streptomyces gedanensis* and its applications for protein hydrolysis / R. Rahulan, K.S. Dhar, K.M. Nampoothiri, A. Pandey // Process Biochemistry. – 2012. – V. 47. – P. 234–242.
22. Adams M.W.W. Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100°C / M.W.W. Adams // Annu Rev Microbiol. – 1993. – V. 47. – P. 627–658.
23. Nampoothiri K.M. L-leucine aminopeptidase production by filamentous *Aspergillus fungi* / K.M. Nampoothiri, V. Nagy, K. Kovacs, G. Szakacs, A. Pandey // Letters in Applied Microbiology. – 2005. – V. 41. – P. 498–504.
24. Clemente A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition / A. Clemente // Trends Food Sci Technol. – 2000. – V. 11. – P. 254–262.
25. Toldra F. Contribution of muscle amino peptidase to flavor development in dry cured ham / F. Toldra, A.C. Aristoy, M. Flores // Food Res. – 2000. – Int. 33. – P. 181–185.

26. Gobbetti M. The proteolytic system of *Lactobacillus sanfrancisco* CB1: purification and characterization of a proteinase, a dipeptidase, and an aminopeptidase / M. Gobbetti, E. Smacchi, A. Corsetti // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – V. 62. – P. 3220-3226.
27. Shie-Jea L. Extracellular leucine aminopeptidase produced by *Aspergillus oryzae* LL1 and LL2 / L. Shie-Jea, Ch. Li-Lin, W. Chiou-Yen, Ch. Wen-Shen // African Journal of Microbiology Research. – 2010. – V. 4(3). – P. 158-168.
28. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов / И.М. Грачева, А.Ю. Кривова. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Элевар, 2000. – 512 с.
29. Laskar A. Modeling and structural analysis of evolutionarily diverse S8 family serine proteases / A. Laskar, E.J. Rodger, A. Chatterjee, C. Mandal // Bioinformation. – 2011. – V. 7(5). – P. 239-245.
30. Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity / L. Hedstrom // Chem. Rev. – 2002. – V. 102. – P. 4501-4523.
31. Page M.J. Serine peptidases: Classification, structure and function / M.J. Page, E. Di Cera // Cell. Mol. Life Sci. – 2008. – V.65. – P. 1220 – 1236.
32. Polgár L. The catalytic triad of serine peptidases / L. Polgár // CMLS. – 2005. – V. 62. – P. 2161–2172.
33. Tripathi L.P. Genome-wide survey of prokaryotic serine proteases: Analysis of distribution and domain architectures of five serine protease families in prokaryotes / L.P. Tripathi, R. Sowdhamini // BMC Genomics. – 2008. – V. 9. – P. 549-576.
34. Немова Н.Н. К вопросу об эволюции протеолитических ферментов / Н.Н. Немова, Л.А. Бондарева // Биомедицинская химия. – 2008. – Т. 54(1). – С. 42-57.
35. Czapinska R. Structural and energetic determinants of the S1-site specificity in serine proteases / R. Czapinska, J. Otlenski // Eur. J. Bioch. – 1999. – V.260. – P. 571-595.
36. Руденская Г.Н. Новые подсемейства субтилизинов / Г.Н. Руденская // Биоорг. Химия. – 1994. – В. 20(5). – С. 475–484.

37. Bedford M.R. Enzymes in farm animal nutrition / M.R. Bedford, G.G. Partridge. – UK: CAB International, 2010. – 319 p.
38. Tremacoldi C.R. Purification and properties of an alkaline protease of *Aspergillus clavatus* / C.R. Tremacoldi, R. Monti, H.S. Selistre-De-Araujo, E.C. Carmona // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – V. 23. – P. 295–299.
39. Barrett A.J. Handbook of Proteolytic Enzymes / A.J. Barrett, N.D. Rawlings, J.F. Woessner (Eds). – 3rd Edition. – San Diego: Academic Press, 2012. – 4104 p.
40. Kudryavtseva O.A. Fungal proteolytic enzymes: features of the extracellular proteases of xylotrophic basidiomycetes / O.A. Kudryavtseva, Ya.E. Dunaevsky, O.V. Kamzolkin, M.A. Belozersky // Mikrobiologiya. – 2008. – V. 77(6). – P. 725–737
41. Barrett A.J. Proteolytic enzymes: aspartic and metallopeptidases / A.J. Barrett // Methods Enzymol. – 1995. – V. 248. – P. 183.
42. Palashoff M.H. Determining the specificity of pepsin for proteolytic digestion: Chemistry Master's Theses / Palashoff Melissa H. – Northeastern University Boston, Massachusetts, 2008. – 144 p.
43. Sielecki A.R. Refined structure of porcine pepsinogen at 1,8Å resolution / A.R. Sielecki, M. Fujinaga, R.J. Read, N.G. James // J. Mol. Biol. – 1991. – V. 219. – P. 671–692.
44. Polgar L. The mechanism of action of aspartic proteases involves 'push-pull' catalysis / L. Polgar // Federation of European Biochemical Societies. – 1987. – V. 219(1). – P. 1–4.
45. Davies D.R. The structure and function of the aspartic proteinases / D.R. Davies // Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. – 1990. – V. 19. – P. 189-215.
46. Sielecki A.R. Molecular and crystal structures of monoclinic porcine pepsin refined at 1.8 Å resolution / A.R. Sielecki, A.A. Fedorov, et al. // J. Mol. Biol. – 1990. – V. 214. – P. 143-170.
47. Dunn B.M. Overview of pepsin-like aspartic peptidases / B.M. Dunn // Curr. Protoc. Protein Sci. – 2001. – Ch. 21. – P. 21-23.

48. James M.N. Molecular structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 Å resolution / M.N. James, A.R. Sielecki // *Nature*. – 1986. – V. 319 (6048). – P. 33-38.
49. Fruton J.S. The specificity and mechanism of pepsin action / J.S. Fruton // *Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* – 1970. – V. 33. – P. 401-443.
50. Zhang Z. Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation / Z. Zhang, D.L. Smith // *Protein Sci.* – 1993. – V. 2. – P. 522-531.
51. Пащенко Л.П. Функциональные пищевые продукты на основе пищевой комбинаторики / Л.П. Пащенко, Е.Е. Курчаева, М.П. Бахмет // *Известия вузов. Пищевая технология*. – 2012. – № 2–3. – С. 84–87.
52. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение / Л.Я Телишевская. – М.: Аграрная наука, 2000. – 295 с.
53. Смагина А.В. Анализ использования соевого белка в пищевой промышленности / А.В. Смагина, М.В. Сытова // *Научные труды Дальрыбвтуза*. – 2011. – № 23. – С. 73-78.
54. Долгополова Н.В. Значение озимой и яровой пшеницы в производстве продуктов питания / Н.В. Долгополова, В.А. Скрипин, О.М. Шершнёва, Ю.В. Алябьева // *Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии*. – 2009. – № 5. – С. 52–56.
55. Казаков Е.Д. Биохимия зерна и хлебопродуктов / Е.Д. Казаков, Г.П. Карпиленко. – 3-е изд., перераб. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2005. – 512 с.
56. Šramková Z. Chemical composition and nutritional quality of wheat grain / Z. Šramková, E. Gregová, E. Šturdíka // *Acta Chimica Slovaca*. – 2009. – V. 2(1). – P. 115-138.
57. Koehler P. Chemistry of Cereal Grains // *Handbook on Sourdough Biotechnology* / P. Koehler, H. Wieser / Ed. M. Gobbetti, M. Ganzle. – NY: Springer Science+Business Media, 2013. – Ch.2. – P. 11-45.

58. Нечаев А.П. Пищевая химия / А.П. Нечаев, С.Е. Траубенберг, А.А. Кочеткова и др.; Под ред. А.П. Нечаева. – 4-е изд., испр. и доп. – СПб: ГИОРД, 2007. – 640 с.
59. Kowieska A. Chemical composition and nutritional characteristics of several cereal grain / A. Kowieska, R. Lubowicki, I. Jaskowska // *Acta Sci. Pol., Zootechnica*. – 2011. – V. 10 (2). – P. 37–50.
60. Кислухина О.В. Биотехнологические основы переработки растительного сырья / О.В. Кислухина, И.И. Кюдулас. – Каунас: Технология, 1997. – 183 с.
61. Stone B.A Chemistry and biology of 1,3- β -glucans / B.A. Stone, A.E. Clarke. – Bundoora: La Trobe University Press, 1992. – 803 p.
62. Растительный белок / Пер. с фр. В.Г. Долгополова; Под ред. Т.П. Микулович. – М.: Агропромиздат, 1991. – 684 с.
63. Geisenhoff H. Bitterness of soy protein hydrolysates according to molecular weight of peptides: Graduate Theses and Dissertations Master of Science / Geisenhoff Heidi. – Iowa State University, Iowa, 2009. – 107 p.
64. Gibbs B.F. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food / B.F. Gibbs, A. Zougman, R. Masse, C. Mulligan // *Food Research International*. – 2004. – V.37. – P. 123–131.
65. Peisker M. Manufacturing of soy protein concentrate for animal nutrition / M. Peisker // *Cahiers Options Mediterraneennes*. – 2001. – V. 54. – P. 103-107.
66. Yang W.W. Soybean allergens: presence, detection and methods for mitigation, soybean and health / W.W. Yang, E. Gonzalez de Mejia, H. Zheng, Y. Lee; Edited by Prof. Hany El-Shemy. – InTech, 2011. – 502 p.
67. Химический состав российских пищевых продуктов: Справочник / Под ред. И.М. Скурихина, В.А. Тутельяна. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 236 с.
68. Таблицы химического состава и калорийности российских пищевых продуктов питания: справочник / Под ред. И.М. Скурихина, В.А. Тутельяна. – М.: ДеЛи принт, 2007. – 275 с.

69. Дремучева Г.Ф. Исследование хлебопекарных свойств пшеничной муки, перерабатываемой хлебопекарными предприятиями в 2015 г./ Г.Ф. Дремучева, О.Е. Карчевская, Н.А. Киндра, Н.Г. Бессонова // Материалы докладов Международной конференции «Хлебопекарное производство – 2015» // Международная промышленная академия 30 ноября – 2 декабря 2015 г. – М.: 2015. – 122 с.
70. Sumantha A. Production and partial purification of a neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation / A. Sumantha, C. Sandhya, G. Szakacs, C.R. Soccol, A. Pandey // Food Technol. Biotechnol. – 2005. – V. 43(4). – P. 313–319.
71. Kumar N.S. A review on microbial proteases / N.S. Kumar, Sreeja Devi P.S., A.S. Nair // International Journal of Advanced Research. – 2016. – V. 4 (7). – 2048–2053.
72. Butt M.S. Xylanases in baking industry / M.S. Butt et al. // Food Technol. Biotechnol. – 2008. – V.46 (1). – P. 22–31.
73. Patent US. № 8697425. Composite yeast suitable for high concentration alcohol fermentation / Xuefeng Yu, Zhihong Li, Minghua Yu, Juan Yao, Zhijun Li, Daiwu Liu. China, 2014.
74. Reid V.J. Extracellular acid proteases of wine microorganisms: gene identification, activity characterization and impact on wine: MS dissertation / V.J. Reid. – Stellenbosch University, South Africa, 2012.
75. Marangon M. Degradation of white wine haze proteins by Aspergillopepsin I and II during juice flash pasteurization / M. Marangon, S. C. Van Sluyter, E. M. C. Robinson et al. // Food Chemistry. – 2012. – V. 135 (3). – P. 1157–1165.
76. Patent US. №8257760. Method for the prevention or reduction of haze in beverages / Edens L., Lopez M. Netherlands, 2012.
77. Кононенко С.В. Ферментный препарат в кормлении свиней / С.В. Кононенко // Научный журнал КубГАУ. – 2012. – №78 (04). – С. 1-23.
78. Ravindran V. Advances and future directions in poultry nutrition: An Overview / V. Ravindran // Korean J. Poult. Sci. – 2012. – V. 39(1). – P. 53–62.

79. Asmare B. Effect of common feed enzymes on nutrient utilization of monogastric animals / B. Asmare // IJBMBR. – 2014. – V. 5(4). P. 27–34.
80. Titi H.H. Evaluation of feeding a fibrolytic enzyme to lactating dairy cows on their lactational performance during early lactation / H.H. Titi // Asian-Aust. J. Anim. Sci. – 2003. – V. 16(5). – P. 677–684.
81. Meng X. Degradation of cell wall polysaccharides by combinations of carbohydrase enzymes and their effect on nutrient utilization and broiler chicken performance / X. Meng, B.A. Slominski, C.M. Nyachoti, L.D. Campbell, W. Guenter // Poultry Science. – 2005. – V. 8. – P. 37–47.
82. Tavano O.L. Biotechnological applications of proteases in food technology / O.L. Tavano, A. Berenguer-Murcia, F. Secundo, R. Fernandez-Lafuente // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2018. – V. 17. – P. 412–436.
83. Costa F.G.P. Economic and environmental impact of using exogenous enzymes on poultry feeding / F.G.P. Costa, C.C. Goulart, D.F. Figueiredo, C.F.S. Oliveira, J.H.V. Silva // International Journal of Poultry Science. – 2008. – V. 7 (4). – P. 311–314.
84. Haq I.U. Production of protease by *Penicillium chrysogenum* through optimization of environmental conditions / I.U. Haq, H. Mukhtar, H. Umber // J of Agri Social Sci. – 2006. – V. 2(1). – P. 23–25.
85. Mikhailova R.V. Proteolytic enzymes of mycelial fungi / R.V. Mikhailova // Microbiol. And Biotechnol. – 2011. – №3. – P. 47–62.
86. Sumantha A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade Proteases: A perspective / A. Sumantha, C. Larroche, A. Pandey // Food Technol. Biotechnol. – 2006. – V. 44(2). – P. 211–220
87. Source Book of Enzymes / J.S. White, D.C. White. – N.Y.: Taylor Francis Inc, 1997. – 1328 p.
88. Jeske L. BRENDA in 2019: a European ELIXIR core data resource / L. Jeske, S. Placzek, I. Schomburg, A. Chang, D. Schomburg // Nucleic Acids Research. – 2019. – V. 47. – P. D542–D549.

89. Mienda B.S. An overview of microbial proteases for industrial applications / B.S. Mienda, A. Yahya, I.A. Galadima, M.S. Shamsir // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2014. – V. 5(1). – P. 388–396.
90. Singhal P. Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases / P. Singhal, V.K. Nigam, A.S. Vidyarthi // International Journal of Advanced Biotechnology and Research. – 2012. – V. 3(3). – P.653–669.
91. Sharma N. Production, purification and crystallization of an alkaline protease from *Aspergillus tamarii* [EF661565.1] / N. Sharma, K. De // Agriculture And Biology Journal Of North America. – 2011. – V. 2(7). – P. 1135–1142.
92. Guo J.-P. High-level expression, purification and characterization of recombinant *Aspergillus oryzae* alkaline protease in *Pichia pastoris* / J.-P. Guo, Y. Ma // Protein Expression and Purification. – 2008. – V. 58. – P. 301–308.
93. Fickers P. *Pichia pastoris*: a workhorse for recombinant protein production / P. Fickers // Curr Res Microbiol Biotechnol. – 2014. – V. 2(3). – P. 354–363.
94. Cheevadhanarak S. Cloning and selective overexpression of an alkaline protease-encoding gene from *Aspergillus oryzae* / S. Cheevadhanarak, D.V. Renno, G. Saunders, G. Holt // Gene. – 1991. – V. 108. – P. 151–155.
95. Chien H.C.R. Purification, characterization, and genetic analysis of a leucine amino peptidase from *Aspergillus sojae* / H.C.R. Chien, L.L. Lin, S.H. Chao, C.C. Chen, W.C. Wang, C.Y. Shaw // Biochim Biophys Acta. – 2002. – V. 1576. – P. 119–126.
96. Blinkovsky A.M. A non-specific aminopeptidase from *Aspergillus* / A.M. Blinkovsky, T. Byun, K.M. Brown, E.J. Golightly, A.V. Klotz // Biochim Biophys Acta. – 2000. – V. 1480. – P. 171–181.
97. Hajji M. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1 / M. Hajji, S. Kanoun, M. Nasri, N. Gharshallah // Proc Biochem. – 2007. – V. 42. – P. 791–797.

98. Wang S.L. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium / S.L. Wang, Y.H. Chen, C.L. Wang, Y.H. Yen, M.K. Chern // Enzyme Microbiol Technol. – 2005. – V. 36. – P.660–665.
99. Masato H. A serine proteinase of a fungus isolated from dried bonito “Katsuobushi” / H. Masato, O. Takashi, S. Masaaki, I. Kazuo, I. Masaru, M. Noshi // J Ferment Bioeng. – 1995. – V. 80. – 462–466.
100. Boer C.G. Production of extracellular protease by *Aspergillus tamaris* / C.G. Boer, R.M. Peralta // J Basic Microbiol. – 2000. – V. 40. – P. 75–81.
101. Chakrabarti S.K. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2) / S.K. Chakrabarti, N. Matsumura, R.S. Ranu // Curr Microbiol. – 2000. – V. 40. – P. 239–244.
102. Bidochka M.J. Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* / M.J. Bidochka, G.G. Khachatourians // Appl Environ Microbiol. – 1987. – V. 53. – P. 1679–1684.
103. Singh C.J. Optimization of an extracellular protease of *Chrysosporium keratinophilum* and its potential in bioremediation of keratinic wastes / C.J. Singh // Mycopathol. – 2002. – V. 156. – P. 151–156.
104. Sutar I. A low molecular alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* / I. Sutar, M. Srinivasan, H. Vartak // Biotechnol Lett. – 1991. – V. 13. P. 119–124.
105. Pekkarinen A.I. Purification and properties of an alkaline proteinase of *Fusarium culmorum* / A.I. Pekkarinen, B.L. Jones, M.L. Niku-Paavola // Eur J Biochem. – 2002. – V. 269. – P. 798–807.
106. Hasnain S. Purification and characterization of an extracellular thiol-containing serine proteinase from *Thermomyces lanuginosus* / S. Hasnain, K. Adeli, A.C. Storer // Biochem Cell Biol. – 1992. – V. 70. – P. 117–122.
107. Lindberg R.A. Extracellular acid proteases from *Neurospora crassa* / R.A. Lindberg, W.G. Rhodes, L.D. Eirich, H. Drucker // J Bact. – 1982. – V. 150. – P. 1103–1108.

108. Kotlova E.K. Thiol-dependent serine proteinase from *Paecilomyces lilacinus*: Purification and catalytic properties / E.K. Kotlova, N.M. Ivanova, M.P. Yusupova, T.L. Voyushina, N.E. Ivanushkina, G.G. Chestukhina // Biochem (Moscow). – 2007. – V. 72. – P. 117–123.
109. Hashimoto H. Some properties of acid protease from the thermophilic fungus, *Penicillium duponti* K1014 / H. Hashimoto, T. Iwaasa, T. Yokotsuka // Appl Microbiol. – 1973. – V. 25. – P. 578–583.
110. Dahot M.U. Purification and some properties of alkaline protease from *Penicillium expansum* / M.U. Dahot // J Islamic Acad Sci. – 1994. – V. 7. – P. 100–105.
111. Kumar S. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization / S. Kumar, N.S. Sharma, M.R. Saharanb, R. Singh // Proc Biochem. – 2005. – V. 40. – P. 1701–1705.
112. Larcher G. A 33 kDa serine proteinase from *Scedosporium apiospermum* / G. Larcher, B. Cimon, F. Symoensa, G. Tronchin, D. Chabasse, J.P. Bouchara // Biochem J. – 1996. – V. 315. – P. 119–126.
113. Ifrij I.H. Production of neutral and alkaline extracellular proteases by the thermophilic fungus, *Scytalidium thermophilum*, grown on microcrystalline cellulose / I.H. Ifrij, Z.B. Ogel // Biotechnol Lett. – 2002. – V. 24. – P. 1107–1110.
114. Merheb C.W. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus* and its hydrolytic activity on bovine casein / C.W. Merheb, H. Cabral, E. Gomes, R. Da-Silva // Food Chem. – 2007. – V. 104. – P. 127–131.
115. Xiaoyun Su. Heterologous gene expression in filamentous fungi / Su Xiaoyun, G. Schmitz, M. Zhang, Roderick I. Mackie, I.K.O. Cann // Advances in Applied Microbiology. – 2012. – V. 81. – P. 1–61.
116. Lubertoz D. Development *Aspergillus* as a host for heterologous expression / D. Lubertoz, J.D. Keasling // Biotechnol Adv. – 2009. – V. 27(1). – P. 57–75

117. Punt P.J. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production / P.J. Punt, N. van Biezen, A. Conesa, A. Albers, J. Mangnus, C.A. van den Hondel // Trends Biotechnol. – 2002. – V. 20(5). – P. 200–206.
118. Nevalainen K.M. Heterologous protein expression in filamentous fungi / K.M. Nevalainen, V.S. Te'o, P.L. Bergquist // Trends Biotechnol. – 2005. – V.23(9). – P. 468–474.
119. Keranen K.M. Production of recombinant proteins in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* / K.M. Keranen, M. Penttila // Curr Opin Biotechnol. – 1995. – V. 6(5). – P. 534–537.
120. Visser H. Development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a *Myceliophthora thermophila* isolate, previously known as *Chrysosporium lucknowense* / H. Visser, V. Joosten, P. Pj et al. // Ind Biotechnol. – 2011. – V. 7(3). – P. 214–223.
121. Николаев И.В. Суперпродукция секретируемой бета-галактозидазы мицелиальным грибом *Penicillium canescens*: структура гена и конструкция мультикопийного продуцента / И.В. Николаев, О.Б. Беккер, В.А. Серебряный, А.М. Чулкин, Ю.П. Винецкий. // Биотехнология. – 1999. – №3. – С. 3–13.
122. Vavilova E.A. Mechanism of overproduction of secreted enzymes in the mycelial fungus *Penicillium canescens* / E.A. Vavilova, S.V. Antonova, E.D. Barsukov, Y.P. Vinetsky // Appl Biochem Microbiol. – 2003. – V. 39(3). – P.:284–282.
123. Vavilova E.A. Induction of the synthesis of endo-1,4- β -xylanase and β -Galactosidase in the original and recombinant strains of the fungus *Penicillium canescens* / E.A. Vavilova, Y.P. Vinetsky // Appl Biochem Microbiol. – 2003. – V. 39(2). – P. 167–172.
124. van Peij N.N. The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger* / N.N. van Peij, M.M.C. Gielkens, R.P. de Vries, J. Visser, L.H. de Graaff // Appl Environ Microbiol. – 1998. – V.64. – P. 3615–3619

125. Mach R.L. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma* / R.L. Mach, S. Zeilinger // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2003. V. 60. – P. 515–522.
126. Патент №2238974 С2 РФ, С12N1/21, С12N15/00 С12N1/21, С12R1:80. Фрагмент ДНК мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*, кодирующий синтез секретируемой эндоглюканазы III и группа штаммов *Penicillium canescens*, синтезирующих эндоглюканазу III *Penicillium verruculosum*, сконструированных методами трансформации и генетической инженерии на основе этого фрагмента ДНК / Е.А. Вавилова, Ю.П. Винецкий и др. Заявка № 2001124653/13 от 06.09.2001. Оpubл. 27.10.2004.
127. Серебряный В.А. Клонирование гена эндо-1,4- β -ксилаказы *Penicillium canescens* и получение мультикоопийных штаммов / В.А. Серебряный, Е.А. Вавилова, А.М. Чулкин, Ю.П. Винецкий // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2002. – Т. 38. № 5. – С. 495–501.
128. Волков П.В. Создание системы экспрессии генов в рекомбинантном штамме *Penicillium canescens* на основе промотора гена α -L-арабинофуранозидазы / П.В. Волков, А.М. Рожкова, А.П. Сеницын // *Московская международная научно-практическая конференция "БИОТЕХНОЛОГИЯ: экология крупных городов"*, 15-17 Марта, Москва, 2010. – С.318–319.
129. Рожкова А.М. Создание продуцентов биотехнологически важных ферментов на основе рекомбинантного штамма гриба *Penicillium canescens* / А.М. Рожкова, П.В. Волков, Е.А. Кондратьева, А.Д. Сатрутдинов и др // *Хранение и переработка сельхозсырья.* – 2010. – № 7. – С. 37–39.
130. Польшалина Г.В. Определение активности ферментов. Справочник / Г.В. Польшалина, В.С. Чередниченко, Л.В. Римарева. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 375 с.

131. Food chemicals codex / Committee on food chemicals codex, Food and nutrition board, Institute of medicine, National academy of sciences. – 4th ed. – Washington: National Academy Press, 1996. – 882 p.
132. ГОСТ 20264.2-88. Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности. – Введ. 03.05.1988. – М: Государственный комитет СССР по стандартам, 1988. – 16 с.
133. Sigma quality control test procedure. Enzymatic assay of leucine aminopeptidase, microsomal (EC 3.4.11.2). – 1996. – Режим доступа: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/l6007enz.pdf (дата последнего обращения 08.11.2018)
134. Синицын А.П. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов / А.П. Синицын, А.В. Гусаков, В.А. Черноглазов. – М.: МГУ, 1995. – 144 с.
135. Досон Р. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Элиот, У. Элиот, К. Джонс. М.: Мир, 1991. – 543 с.
136. Инструкция по теххимическому и микробиологическому контролю спиртового производства / И.М. Абрамова, Г.В. Польшалина / под ред. В.А. Полякова. – М.: ДеЛи принт, 2007. – 480 с.
137. Sättler A. Temperature-gradient gel electrophoresis for analysis and screening of thermostable proteases / A. Sättler, D. Riesner // Electrophoresis. – 1993. – V. 14(8). – P. 782–788.
138. Марков А.В. Свойства ферментных комплексов, продуцируемых мутантными штаммами *Trichoderma reesei*: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.15, 03.00.23 / Марков Александр Владимирович. – М., 2003. – 201 с.
139. Fischer M. Limiting factors for the enzymatic accessibility of soybean protein: Ph.D. Thesis / M. Fischer. – Wageningen University, The Netherlands, 2006. – 140 p.
140. Marsman G.J.P. *In vitro* accessibility of untreated, toasted and extruded soybean meals for proteases and carbohydrases / G.J.P. Marsman, H. Gruppen,

- A.J. Mul, A.G.J. Voragen // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1997. – №10. – P. 4088–4095.
141. Kumar C.G. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint / C.G. Kumar // Biotechnology Advances. – 1999. – V. 17. – P. 561–594.
142. Ellaiah P. A review on microbial alkaline proteases / P. Ellaiah // Journal of Scientific and Industrial Research. – 2002. – V. 61. – P. 690–704.
143. Moure A. Fractionation and enzymatic hydrolysis of soluble protein present in waste liquors from soy processing / A. Moure, H. Dominguez, J.C. Parajo // J Agr Food Chem. – 2005. – V. 53(19). – P. 7600–7608.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Идентификация белков в образцах культуральной жидкости трансформантов штамма *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻

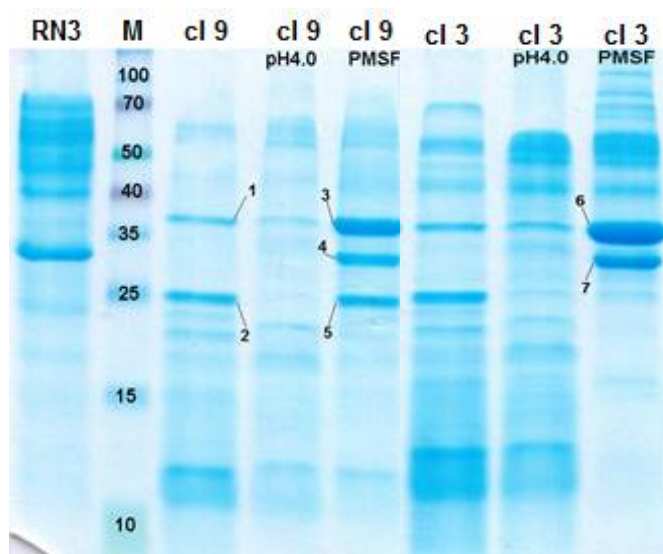


Рисунок – Электрофореграмма образцов культуральной жидкости трансформантов (cl 3 и cl 9) штамма *P. canescens* RN3-11-7 *niaD*⁻ с добавлением ингибиторов протеаз и без

Для точной идентификации белков были вырезаны фрагменты геля (образцы №№ 1-7) и отданы на масс-спектрометрический анализ в ФИЦ Биотехнологии РАН (ЦКП ИНБИ РАН).

Для идентификации белков по масс-спектрометрическим данным использовалась программа Mascot.

Образец №1

Protein View: ORYZ ASPOR

Alkaline protease 1 OS=Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40) GN=alp1 PE=1 SV=2

Database:	SwissProt
Score:	107
Expect:	6.2e-07
Nominal mass (M_r):	42546
Calculated pI:	5.95
Taxonomy:	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of ORYZ ASPOR against nr](#).

Search parameters

MS data file:	peaklist.xml
----------------------	--------------

Enzyme:	Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Mass values searched:	20
Mass values matched:	9

Protein sequence coverage: 45%

Matched peptides shown in **bold red**.

1 MQSIKRTLLL LGAILPAVLG APVQETRRAA EKLPVKYIVT FKPGIDEAKI
51 QEHTTWATNI HQRSLERRGA TGGDLPVGIE RNYKINKFAA YAGSFDDATI
101 EEIRKNEDVA YVEEDQIYYL DGLTTQK**SAP WGLGSISHKG QQSTDYIYDT**
151 **SAGEGTYAYV VDSGVNVDHE EFEGRASKAY NAAGGQHVDs IGHGTHVSGT**
201 **IAGK**TYGIAK KASILSVK**VF QGESSTSVI LDGFNWAAND IVSKKRTSKA**
251 **AINMSLGGGY SKAFNDAVEN AFEQGVLSVV AAGNENS DAG QTSPASAPDA**
301 **ITVAAIQKSN NRASFSNFGK VVDVFAPGQD ILSAWIGSSS ATNTISGTSM**
351 ATPHIVGLSL YLAALENLDG PAAVTKRIKE LATKDVVKDV **KGSPNLLAYN**
401 **GNA**

Образец № 2

Protein View: ORYZ ASPOR

Alkaline protease 1 OS=Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40) GN=alp1 PE=1 SV=2

Database:	SwissProt
Score:	64
Expect:	0.012
Nominal mass (M_r):	42546
Calculated pI:	5.95
Taxonomy:	<i>Aspergillus oryzae RIB40</i>

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of ORYZ ASPOR against nr](#).

Search parameters

MS data file:	peaklist.xml
Enzyme:	Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Mass values searched:	19
Mass values matched:	6

Protein sequence coverage: 25%

Matched peptides shown in **bold red**.

1 MQSIKRTLLL LGAILPAVLG APVQETRRAA EKLPVKYIVT FKPGIDEAKI
51 QEHTTWATNI HQRSLERRGA TGGDLPVGIE RNYKINKFAA YAGSFDDATI
101 EEIRKNEDVA YVEEDQIYYL DGLTTQK**SAP WGLGSISHKG QQSTDYIYDT**
151 **SAGEGTYAYV VDSGVNVDHE EFEGRASKAY NAAGGQHVDs IGHGTHVSGT**
201 **IAGK**TYGIAK KASILSVK**VF QGESSTSVI LDGFNWAAND IVSKKRTSKA**
251 AINMSLGGGY SKAFNDAVEN AFEQGVLSVV AAGNENS DAG QTSPASAPDA
301 ITVAAIQKSN NRASFSNFGK VVDVFAPGQD ILSAWIGSSS ATNTISGTSM
351 ATPHIVGLSL YLAALENLDG PAAVTKRIKE LATKDVVKDV **KGSPNLLAYN**
401 **GNA**

Образец № 3

Protein View: ORYZ ASPOR

Alkaline protease 1 OS=Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40) GN=alp1 PE=1 SV=2

Database: SwissProt
Score: 87
Expect: 6.2e-05
Nominal mass (M_r): 42546

Calculated pI: 5.95

Taxonomy: [Aspergillus oryzae RIB40](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of ORYZ_ASPOR against nr.](#)

Search parameters

MS data file: peaklist.xml

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Mass values searched: 41

Mass values matched: 10

Protein sequence coverage: 59%

Matched peptides shown in **bold red**.

1	MQSIKRTLLL	LGAILPAVLG	APVQETRRAA	EKLPGKYIVT	FKPGIDEAKI
51	QEHTTWATNI	HQRSLERRGA	TGGDLPVGIE	RNYKINKFAA	YAGSFDDATI
101	EEIRKNEDVA	YVEEDQIYYL	DGLTTQK SAP	WGLGSISHKG	QQSTDYIYDT
151	SAGEGTYAYV	VDSGVNVDHE	EFEGRASKAY	NAAGGQHVDS	IGHGTHVSGT
201	IAGKTYGIAK	KASILSVKVF	QGESSTSVI	LDGFNWAAND	IVSKKRTSKA
251	AINMSLGGGY	SKAFNDAVEN	AFEQGVLSVV	AAGNENS DAG	QTSPASAPDA
301	ITVAAIQKSN	NRASFSNFGK	VVDVFAPGQD	ILSAWIGSSS	ATNTISGTSM
351	ATPHIVGLSL	YLAALNLDG	PAAVTKRIKE	LATKDVVKDV	KGSPNLLAYN
401	GNA				

Образец № 4

Protein View: XYNA_PENCN

Endo-1,4-beta-xylanase A OS=Penicillium canescens GN=xylA PE=1 SV=1

Database:	SwissProt
Score:	189
Expect:	3.9e-15
Nominal mass (M _r):	35069
Calculated pI:	8.33
Taxonomy:	Penicillium canescens

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of XYNA_PENCN against nr.](#)

Search parameters

MS data file:	peaklist.xml
Enzyme:	Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Mass values searched:	43
Mass values matched:	20

Protein sequence coverage: 80%

Matched peptides shown in **bold red**.

1	MVQLKTAALA	LLFAGQALSG	PVDSRQASVS	IDAKFKAHGK	KYLGITIGDQY
51	TLTKNTKNPA	IKADFGQLT	PENSMKWDAT	EPNRGQFTFS	GSDYLVNFAQ
101	SNGKLIRGHT	LVWHSQLPGW	VSSITDKNTL	ISVLKNHITT	VMTRYKGGKIY
151	AWDVLNEIFN	EDGSLRNSVF	YNVIGEDYVR	IAFETARSVD	PNAKLYINDY
201	NLDSAGYSKV	NGMVSHVKKW	LAAGIPIDGI	GSQTHLGAGA	GSAVAGALNA
251	LASAGTKEIA	ITELDIAGAS	STDYVNVVNA	CLNQAKCVGI	TVWGVADPDS
301	WRSSSSPLLF	DGNYNPKAAY	NAIANAL		

Образец № 5

Protein View: ORYZ_ASPOR

Alkaline protease 1 OS=Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40) GN=alp1 PE=1 SV=2

Database:	SwissProt
Score:	51
Expect:	1.4

Nominal mass (M _r):	42546
Calculated pI:	5.95
Taxonomy:	Aspergillus oryzae RIB40

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of ORYZ_ASPOR against nr](#).

Search parameters

MS data file:	peaklist.xml
Enzyme:	Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Mass values searched:	28
Mass values matched:	6

Protein sequence coverage: 29%

Matched peptides shown in **bold red**.

1	MQSIKRTL	LL	LGAILPAVLG	APVQETRRAA	EKLPGKYIVT	FKPGIDEAKI
51	QEHTTWATNI	HQRSLERRGA	TGGDLPVGIE	RNYKINKFAA	YAGSFDDATI	
101	EEIRKNEDVA	YVEEDQIYYL	DGLTTQK SAP	WGLGSISHKG	QQSTDYIYDT	
151	SAGEGTYAYV	VDSGVNVDHE	EFEGRASKAY	NAAGGQHVDS	IGHGTHVSGT	
201	IAGKTYGIAK	KASILSVK VF	QGESSTSVI	LDGFNWAAND	IVSKKRTSKA	
251	AINMSLGGGY	SKAFNDAVEN	AFEQGVLSVV	AAGNENS DAG	QTSPASAPDA	
301	ITVAAIQKSN	NRASFNF GK	VVDVFAPGQD	ILSAWIGSSS	ATNTISGTSM	
351	ATPHIVGLSL	YLAALENLDG	PAAVTKRIKE	LATKDVVKDV	KGSPNLLAYN	
401	GNA					

Образец № 6

Protein View: *ORYZ_ASPOR*

Alkaline protease 1 OS=Aspergillus oryzae (strain ATCC 42149 / RIB 40) GN=alp1 PE=1 SV=2

Database:	SwissProt
Score:	106
Expect:	1.4e-05
Nominal mass (M _r):	42546
Calculated pI:	5.95
Taxonomy:	Aspergillus oryzae RIB40

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of ORYZ_ASPOR against nr](#).

Search parameters

MS data file:	peaklist.xml
Enzyme:	Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Mass values searched:	29
Mass values matched:	11

Protein sequence coverage: 61%

Matched peptides shown in **bold red**.

1	MQSIKRTL	LL	LGAILPAVLG	APVQETRRAA	EKLPGKYIVT	FKPGIDEAKI
51	QEHTTWATNI	HQRSLERRGA	TGGDLPVGIE	RNYKINKFAA	YAGSFDDATI	
101	EEIRKNEDVA	YVEEDQIYYL	DGLTTQK SAP	WGLGSISHKG	QQSTDYIYDT	
151	SAGEGTYAYV	VDSGVNVDHE	EFEGRASKAY	NAAGGQHVDS	IGHGTHVSGT	
201	IAGKTYGIAK	KASILSVK VF	QGESSTSVI	LDGFNWAAND	IVSKKRTSKA	
251	AINMSLGGGY	SKAFNDAVEN	AFEQGVLSVV	AAGNENS DAG	QTSPASAPDA	
301	ITVAAIQKSN	NRASFNF GK	VVDVFAPGQD	ILSAWIGSSS	ATNTISGTSM	
351	ATPHIVGLSL	YLAALENLDG	PAAVTKRIKE	LATKDVVKDV	KGSPNLLAYN	
401	GNA					

Образец №7

Protein View: XYNA_PENCN

Endo-1,4-beta-xylanase A OS=Penicillium canescens GN=xylA PE=1 SV=1

Database:	SwissProt
Score:	169
Expect:	6.9e-12
Nominal mass (M_r):	35069
Calculated pI:	8.33
Taxonomy:	<i>Penicillium canescens</i>

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of XYNA_PENCN against nr](#).

Search parameters

MS data file:	peaklist.xml
Enzyme:	Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Mass values searched:	40
Mass values matched:	16

Protein sequence coverage: 70%

Matched peptides shown in **bold red**.

1	MVQLKTAALA	LLFAGQALSG	PVDSRQASVS	IDAKFKAHGK	KYLGITIGDQY
51	TLTKNTKNPA	I IKADFGQLT	PENSMKWDA	TPNRGQFTFS	GSDYLVNFAQ
101	SNGKLIRGHT	LVWHSQLPGW	VSSITDKNTL	ISVLKNHITT	VMTRYKGGKIY
151	AWDVLNEIFN	EDGSLRNSVF	YNVIGEDYVR	IAFETARSVD	PNAKLYINDY
201	NLDSAGYSKV	NGMVSHVKKW	LAAGIPIDGI	GSQTHLGAGA	GSAVAGALNA
251	LASAGTKEIA	ITELDIAGAS	STDYVNVVNA	CLNQAKCVGI	TVWGVADPDS
301	WRSSSSPLLF	DGNYNPKAAY	NAIANAL		

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Патенты на изобретение

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2636040

**ШТАММЫ-ПРОДУЦЕНТЫ ФЕРМЕНТОВ И СПОСОБ
ПОЛУЧЕНИЯ МУЛЬТИЭНЗИМНОЙ КОМПОЗИЦИИ
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО И
ГЕМИЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ,
ПРЕДНАЗНАЧЕННОЙ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В
КОРМОПРОИЗВОДСТВЕ**

Патентообладатель: *Синицын Аркадий Пантелеймонович (RU)*

Авторы: *Синицын Аркадий Пантелеймонович (RU), Рожкова
Александра Михайловна (RU), Цурикова Нина Васильевна
(RU), Великорецкая Ирина Александровна (RU), Середа Анна
Сергеевна (RU), Костылева Елена Викторовна (RU),
Кондратьева Елена Геннадьевна (RU)*

Заявка № 2016147579

Приоритет изобретения 06 декабря 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 17 ноября 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 06 декабря 2036 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2616276

**ШТАММ ГРИБА *PENICILLIUM CANESCENS* -
ПРОДУЦЕНТ КОМПЛЕКСНОГО ФЕРМЕНТНОГО
ПРЕПАРАТА, ВКЛЮЧАЮЩЕГО ПЕНИЦИЛЛОПЕСИН,
ЭНДО-КСИЛАНАЗУ И β -ГЛЮКАНАЗУ, СПОСОБ
ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА И ЕГО
ПРИМЕНЕНИЕ**

Патентообладатель: *Синицын Аркадий Пантелеймонович (RU)*

Авторы: *Великорейская Ирина Александровна (RU), Серёда Анна
Сергеевна (RU), Костылева Елена Викторовна (RU), Цурикова
Нина Васильевна (RU), Дремучева Галина Федоровна (RU),
Рожкова Александра Михайловна (RU), Синицын Аркадий
Пантелеймонович (RU)*

Заявка № 2016111188

Приоритет изобретения 28 марта 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 13 апреля 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 28 марта 2036 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Акты проведения производственных испытаний технологии культивирования новых рекомбинантных штаммов



«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель генерального
директора по качеству
ООО «Агрофермент»
Кержнер М.А.

«31» марта 2015 г.

А К Т

проведения производственных испытаний технологии культивирования
нового рекомбинантного штамма *Penicillium canescens* *Per-4*
с целью получения комплексного ферментного препарата
пенициллопепсина и карбогидраз

Настоящий акт составлен комиссией в составе главного технолога Ердяковой А.С. и старшего микробиолога Беловой Е.В., о том, что в период с 26 по 31 марта 2015 г в ферментном цехе ООО «Агрофермент» были проведены производственные испытания разработанной во ВНИИПБТ технологии культивирования нового рекомбинантного штамма *Penicillium canescens* *Per-4* продуцента пенициллопепсина и карбогидраз.

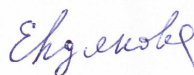
В качестве исходной культуры использовали шт. *Penicillium canescens* *Per-4*, хранящийся на скошенном агар-агаре в музее ВНИИПБТ.

Инокулят выращивали в 1 м³ инокуляторе на ферментационной среде при температуре 28–30°C в течение 25 ч и оборотов мешалки 100% (279 об/мин). Для засева инокуляционной среды использовали 5 л вегетативного посевного материала.

Культивирование проводили на ферментационной среде в ферментере объемом 10 м³, оснащенном барботерами для подачи воздуха в аппарат и турбинной мешалкой, двигатель которой позволяет развивать обороты до 199 об/мин.

4. Полученные результаты свидетельствует об успешном внедрении технологии производства комплексного ферментного препарата пенициллопепсина и карбогидраз в промышленных условиях на основе рекомбинантного штамма.

Начальник ПТО-главный технолог



Ердякова А.С.

Старший микробиолог



Белова Е.В.

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель генерального
директора по качеству
ООО «Агрофермент»
Керашин М.А.
« » 2015 г.



А К Т

проведении производственных испытаний технологии культивирования
нового рекомбинантного штамма *Penicillium canescens* RN3-11-7-7
с целью получения комплексного ферментного препарата протеаз
(пенициллинамина и лейциламинаминопептидазы) и карбогидраз

Настоящий акт составлен комиссией в составе главного технолога Ердяковой А.С. и старшего микробиолога Беловой Е.В., о том, что в период с 6 по 13 октября 2015 г в ферментном цехе ООО «Агрофермент» были проведены производственные испытания разработанной во ВНИИПБТ технологии культивирования нового рекомбинантного штамма *Penicillium canescens* RN3-11-7-7 - продуцента комплекса протеаз и карбогидраз,

В качестве исходной культуры использовали штамм *Penicillium canescens* RN3-11-7-7, хранящийся на скошенном агар-агаре в музее ВНИИПБТ.

Инокулят выращивали в 1 м³ инокуляторе на ферментационной среде при температуре 28-30°C в течение 25 ч и оборотов мешалки 100% (279 об/мин). Для засева инокуляционной среды использовали 5 л вегетативного посевного материала.

Культивирование проводили на ферментационной среде в ферментере объемом 10 м³, оснащенном барботерами для подачи воздуха в аппарат и турбинной мешалкой, двигатель которой позволяет развивать обороты до 199 об/мин.

4. Полученные результаты свидетельствует об успешном внедрении технологии производства комплексного ферментного препарата протеаз (пеницилловерсина и лейцинаминопептидазы) и карбогидраз в промышленных условиях на основе рекомбинантного штамма.

Начальник ПТО-главный технолог
Старший микробиолог



Ердякова А.С.
Белова Е.В.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

ОТЧЕТ

«Изучение влияния мультиферментного препарата «Агропрот» на продуктивность и физиологическое состояние свиней при откорме»

Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт использования
техники и нефтепродуктов в сельском хозяйстве»
(ФГБНУ ВНИИТиН)

«Утверждаю»
Директор
ФГБНУ ВНИИТиН,
доктор технических наук
А.Н. Зазуля
«___» _____ 2016г.



«Утверждаю»
Директор по производству
ООО «Агрофермент»
П.А. Мосеев
«___» _____ 2016 г.



ОТЧЕТ

«Изучение влияния мультиферментного препарата «Агропрот» на продуктивность и физиологическое состояние свиней при откорме»

Исполнитель:
Ведущий научный сотрудник
лаборатории животноводства
ФГБНУ ВНИИТиН,
кандидат сельскохозяйственных наук

 А.Н. Бетин

Зав. лабораторией животноводства
ФГБНУ ВНИИТиН

 Г.М. Шулаев

Тамбов, 2016

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Дипломы





Диплом

Награждается лауреат конкурса научно-инновационных работ молодых ученых и специалистов, проводимого в рамках VIII Международного научно-практического симпозиума «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов»

Великорецкая Ирина Александровна

за работу

**«Получение рекомбинантного штамма – продуцента
грибной сериновой протеазы и ксиланазы»**

26 апреля 2016 года

ВНИИ пищевой биотехнологии –
филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», г. Москва

Директор ВНИИПБТ
академик РАН



В.А.Поляков