



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 1/14 (2024.01); C12N 9/16 (2024.01); C12N 9/242 (2024.01); C12N 15/80 (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2023107126, 24.03.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.06.2022

Дата регистрации:
28.05.2024

Приоритет(ы):

(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2022115892 13.06.2022

(45) Опубликовано: 28.05.2024 Бюл. № 16

Адрес для переписки:
117593, Москва, ул. Соловьиный проезд, 14 кв.
352, Попова Анна Олеговна

(72) Автор(ы):

Синицын Аркадий Пантелеймонович (RU),
Зоров Иван Никитич (RU),
Рожкова Александра Михайловна (RU),
Короткова Ольга Генриховна (RU),
Денисенко Юрий Андреевич (RU),
Шашков Игорь Александрович (RU),
Сатрутдинов Айдар Дамирович (RU),
Синицына Ольга Аркадьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное учреждение
"Федеральный исследовательский центр
"Фундаментальные основы биотехнологии"
Российской академии наук" (ФИЦ
Биотехнологии РАН) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2288267 C2, 27.11.2006. RU
2653429 C1, 08.05.2018. RU 2711578 C1,
17.01.2020. RU 2361918 C1, 20.07.2009.
DOTSENKO A. ET AL. Enhancement of activity
and thermostability of *Aspergillus niger* ATCC
10864 phytase A through rational design.
Biochemical and Biophysical Research
Communications, Volume 634, 2022, Pages 55-61,
(см. прод.)

(54) ШТАММ ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* ПРОДУЦЕНТ КОМПЛЕКСА ФИТАЗЫ А И ЭНДО-1,4- β -КСИЛАНАЗЫ Е И ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ НА ЕГО ОСНОВЕ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ ДОБАВКИ В КОРМАХ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Предложен рекомбинантный штамм *Penicillium verruculosum* PhyXyl-41, депонированный во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером ВКМ F-4896D, предназначенный для продукции гетерологичных высокоактивной фитазы А *Aspergillus niger* и неингибируемой эндо-1,4- β -ксиланазы Е *Penicillium canescens*. Также предложен способ получения ферментного

препарата PhyXyl-41, полученного на основе рекомбинантного штамма *Penicillium verruculosum* PhyXyl-4. Изобретение обеспечивает улучшение усвояемости питательных веществ кормов, снижение вязкости кормов, содержащих некрахмальные полисахариды злаков, и повышение кормовой ценности рационов для моногастричных животных и птицы. 2 н.п. ф-лы, 1 табл., 2 пр.

(56) (продолжение):

doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.10.010. Найдено онлайн: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X2201395X> Дата обращения 15.09.2023.

R U 2 8 1 9 9 1 8 C 1

R U 2 8 1 9 9 1 8 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
C12N 9/30 (2006.01)
C12N 15/80 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 1/14 (2024.01); C12N 9/16 (2024.01); C12N 9/242 (2024.01); C12N 15/80 (2024.01)

(21)(22) Application: **2023107126, 24.03.2023**

(24) Effective date for property rights:
13.06.2022

Registration date:
28.05.2024

Priority:
(62) Number and date of filing of the initial application,
from which the given application is allocated:
2022115892 13.06.2022

(45) Date of publication: **28.05.2024** Bull. № 16

Mail address:
**117593, Moskva, ul. Solovinyj proezd, 14 kv. 352,
Popova Anna Olegovna**

(72) Inventor(s):

**Sinitsyn Arkadii Panteleimonovich (RU),
Zorov Ivan Nikitich (RU),
Rozhkova Aleksandra Mikhailovna (RU),
Korotkova Olga Genrikhovna (RU),
Denisenko Iurii Andreevich (RU),
Shashkov Igor Aleksandrovich (RU),
Satrutdinov Aidar Damirovich (RU),
Sinitsyna Olga Arkadevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe uchrezhdenie
«Federalnyi issledovatel'skii tsentr
«Fundamentalnye osnovy biotekhnologii»
Rossiiskoi akademii nauk» (FITs Biotekhnologii
RAN) (RU)**

(54) **PENICILLIUM VERRUCULOSUM FUNGUS STRAIN AS PRODUCER OF COMPLEX OF PHYTASE A AND ENDO-1,4-β-XYLANASE E AND ENZYME PREPARATION BASED ON IT FOR USE AS ADDITIVE IN FEED**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: disclosed is a recombinant strain of *Penicillium verruculosum* PhyXyl-41, deposited in the Russian National Collection of Microorganisms under number VKM F-4896D, intended for production of heterologous highly active phytase A of *Aspergillus niger* and uninhibited endo-1,4-β-xylanase E *Penicillium canescens*. Also disclosed is a method of producing an enzyme preparation PhyXyl-41, obtained

on the basis of a recombinant strain of *Penicillium verruculosum* PhyXyl-4.

EFFECT: invention improves digestibility of nutrients of fodders, reduces viscosity of fodders containing non-starch polysaccharides of cereals, and increases fodder value of rations for monogastric animals and poultry.

2 cl, 1 tbl, 2 ex

RU 2 819 918 C1

RU 2 819 918 C1

Изобретение относится к области сельскохозяйственной биотехнологии, а именно к созданию и производству комплексных высокоэффективных ферментных препаратов (ФП), содержащих высокоактивные термостабильные ферменты. Изобретение может быть использовано в кормовой отрасли в качестве добавки к кормам сельскохозяйственных животных и птицы, например, поросят или кур-бройлеров, ведущей к уменьшению негативного воздействия некрахмальных полисахаридов (НПС) и фитатов кормов на основе зерновых и бобовых.

В состав полисахаридов клеточной стенки растений входят целлюлоза, гемицеллюлозы и пектиновые вещества. Гемицеллюлозы составляют около 20% (по сухой массе) клеточной стенки растений, а содержание пектиновых веществ может достигать 5-12%. Функциональная роль гемицеллюлоз заключается в том, чтобы обеспечивать взаимосвязь основных компонентов клеточной стенки.

Их соотношение и содержание различно в зависимости от вида корма. Арабиноксиланы в большом количестве находятся в пшенице, рапсе, ячмене, кукурузе (около 7%), β -глюканы - в ячмене и овсе (около 4%). Много пектинов содержится в подсолнечнике, рапсе, горохе и сое (около 6%), галактоолигосахаридов - в сое (4%), а также рапсе (3%). Большое количество НПС также содержит рожь. В отдельных растительных продуктах переработки (например, отрубях) содержание НПС может превышать 20%, а в злаковых их содержание колеблется от 5 до 13%.

Попадая в пищеварительный тракт моногастричных животных (поросят и птицы), НПС затрудняют переваривание и всасывание питательных веществ. В итоге образуется застой желеобразной кормовой массы, которая служит субстратом для развития условно-патогенной микрофлоры. НПС, в большом количестве присутствующие во многих кормах, травмируют слизистые кишечника, могут увеличивать вязкость кормовой массы в кишечнике, затрудняя тем самым процессы всасывания питательных веществ. Большое количество сырой клетчатки в корме сроки прохождения пищи в пищеварительном тракте, препятствуя ферментативным процессам, эвакуируя из кишечника полезную микрофлору.

Моногастричные животные, в силу особенностей пищеварения, отличающиеся от жвачных, практически не могут разрушать межклеточные стенки зерновых компонентов, содержащие в своем составе различные НПС, в связи с этим особую актуальность приобретают использование комплексных ферментных добавок в рационах этих видов животных.

Продукты расщепления НПС могут служить пребиотиком и стимулировать развитие и рост полезной микрофлоры. Применение ферментных препаратов снижает вязкость кормовых масс (химуса) в подвздошной кишке, что позволяет животным лучше переваривать жиры, аминокислоты и минеральные компоненты [*Jacob J.P., Pescatore A.J. // Annals of Translational Medicine, 2014, Vol.2, No.2. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.01.02.*].

Одним из необходимых минеральных веществ для развития здорового организма является фосфор, составляющий основу костной ткани, нуклеиновых кислот, фосфолипидов, молекул-энергоносителей. В зерновых и бобовых растениях около 60-80% общего фосфора находится в форме фитатов - недоступной для питания высших эукариот формой фосфорорганических соединений. Поэтому фосфор является необходимым компонентом комбикормов. Для поддержания здоровья, продуктивности и нормального функционирования организма животных и птицы этот макроэлемент должен поступать с кормом в достаточных количествах. Особенно остро нуждается в фосфоре молодняк, в частности бройлеры. Селекция мясной птицы по скорости роста

привела к тому, что развитие костяка отстаёт от формирования мышечной ткани. В связи с этим у цыплят часто отмечаются аномалии ног незаразной этиологии. Однако, фосфор, в виде фитиновой кислоты и ее солей - фитатов, усваивается взрослой птицей на 50, молодняком - на 30 процентов. Кроме того, фитаты связывают положительно заряженные ионы металлов, относящиеся к макро- и микроэлементам (ионы кальция, цинка, железа, марганца, магния), а также белки, аминокислоты и крахмал, снижая их биодоступность. Фитаза не вырабатывается животными организмами, а в растениях её содержится мало, вследствие чего фосфор практически не доступен птице и другим животным [В.Р. Каиров, Н.Ш. Дзигоева // Известия Горского государственного аграрного университета. Т.49, ч.3, Владикавказ, 2012. - С. 119-121.].

Поэтому для удовлетворения потребностей в фосфоре в комбикорма приходится включать дорогостоящие препараты неорганического фосфора [Ленкова Т.Н., Егорова Т.А., Сыроева И.Г., Кривопишина Л.В. Отечественная фитаза // Птицеводство. 2015. №10. С.2-6]. [Синицын, А. Ферментные препараты на основе фитазы [Текст] / А. Синицын, О. Синицына // Птицеводство. - 2005. - №9. - С.35.].

Таким образом, основным способом уменьшения негативного влияния НПС и фитатов кормов является использование экзогенных ферментов, которые будучи включёнными в состав корма дополняют ферментную систему птицы, обеспечивают переваривание и в результате способствуют улучшению использования питательных веществ рациона, а также улучшают здоровье сельскохозяйственных животных и птицы.

Фитаза переводит связанный, неусвояемый фосфор зерна в доступную для усвоения форму, увеличивает доступность энергии, протеина, макро- и микроэлементов из зерновых, жмыхов и шротов.

В условиях рыночной экономики главной задачей сельскохозяйственных предприятий становится увеличение экономической эффективности производства, повышение продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы и снижение ее себестоимости. Успехи, достигнутые в области изучения роли микрофлоры кишечника в гидролизе сложных органических соединений кормов и всасывания их метаболитов через слизистую оболочку кишечника, в формировании и развитии ферментативного звена пищеварительной системы, явились предпосылкой разработки и использования кормовых ферментных препаратов. Поэтому проблема обеспечения промышленного птицеводства высококачественными ферментными препаратами, подходящими для различного состава рациона, является важной прикладной задачей.

Мицелиальный гриб *Penicillium verruculosum* PV2007 (ВКМ F-3972D) обладает гидролитическим комплексом внеклеточных ферментов, способным к эффективной биоконверсии полисахаридов растительной биомассы, в том числе антипитательной составляющей кормов в виде НПС. В этот комплекс входят целлюбиогидролазы, эндоглюканазы и β -глюкозидаза. На основе реципиентного штамма *P. verruculosum* 537 (Δ niaD) создана экспрессионная система [Патент RU 2378372 C2, опубликовано 10.01.2010, Бюл. №1], что позволяет использовать данный гриб как основу для получения рекомбинантных штаммов - продуцентов ферментов для практического применения в различных областях промышленности и сельского хозяйства [Skomarovsky, A.A., Gusakov, A. V., Okunev, O.N., Solov'eva, I. V., Bubnova, T.V., Kondrat'eva, E.G., Synitsyn, A.P. // Applied Biochemistry and Microbiology. 2005. Vol. 41. P. 182-184; Martins, L.F., Kolling, D., Camassola, M., Dillon, A.J., Ramos, L.P. // Bioresource Technology. 2008. Vol. 99. P. 1417-1424; Gusakov A. V., Sinitsyn A.P. // Biofuels. 2012. Vol. 3(4). P.463-477].

Для кормовой отрасли наиболее востребованы ферменты, действующие при низких значениях pH. К ним относятся фитазы, синтезируемые представителями рода *Aspergillus*,

которые являются промышленными продуцентами многочисленного ряда пищевых микроингредиентов.

Фитаза *A. niger* является высокоактивным ферментом, способным осуществлять деструкцию фитата до мио-инозит-2-монофосфата и устойчивым к протеолитической деградации пепсином [Golovan S., Wang G., Zhang J., Forsberg C.W. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli* appA encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities // *Can. J. Microbiol.* 2000. V. 46. P. 59-71; Wyss, M., Brugger, R., Kroneneberger, A., Remy, R., Fimbel, R., Oesterheld, G., Lehmann, M., and van Loon, A.P.G.M. Biochemical Characterization of Fungal Phytases (myo-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases): Catalytic Properties // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. 65. P. 367-373.].

Таким образом, наличие фитазы А в комплексе ферментов, секретируемых штаммом *P. verruculosum*, позволит значительно увеличить биодоступность фосфора и минеральных веществ кормов на основе зерновых культур.

Известно, что эндо-β-1,4-ксилазы, катализирующие неупорядоченный гидролиз ксилозных связей между остатками D-ксилозы в основной цепи ксиланов, широко применяются в кормовой промышленности для разрушения НПС злаковых культур, используемых в кормлении моногастрических животных и птицы.

Стоит, однако, отметить, что применяемые на практике ФП ксиланаз не обладают необходимыми свойствами: достаточной термостабильностью, высокой удельной активностью, а также устойчивостью по отношению к белковым ингибиторам злаков (последние оказывают негативное действие на ксиланазы при гидролизе ксиланов, содержащихся в зерне злаков [Гусаков А.В. // *Биохимия.* 2010. Т. 75. № 10. С. 1331.]).

Обнаружено, что эндо-1,4-β-ксилаза *E. P. canescens*, принадлежащая 10-й семье гликозид-гидролаз, является весьма перспективным ферментом для использования в качестве добавки к комбикормам на основе злаков, поскольку она устойчива к действию белковых ингибиторов, присутствующих в злаках, таких как рожь, пшеница, ячмень, а также обеспечивает глубокую степень гидролиза арабиноксилана [Ю.А. Денисенко, Д.А. Мерзлов, А.В. Гусаков, А.В. Чекушина, А.П. Сеницын. // *Сравнительная характеристика ксиланаз XylA И XylE из гриба Penicillium canescens.* // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия.* 2015. Т. 56. № 6. С.348-353, Патент РФ №2653429 С1 от 08.05.2018, Бюл. №13].

В связи с этим, наличие в составе нового ФП термостабильной, неингибируемой ксиланазы, позволит значительно уменьшить вязкость НПС кормов за счёт гидролиза высоковязких растворимых в водной среде ксиланов и уменьшения их степени полимеризации, что приведет к улучшению усвояемости животными питательных веществ кормов на основе пшеницы и ржи, а совместно с фитазой *A. niger* позволит эффективно использовать в рационе животных соевые и подсолнечные шроты.

Таким образом, создание нового рекомбинантного штамма *P. verruculosum* с высоким уровнем экспрессии гетерологичных фитазы *A. niger* и эндо-1,4-β-ксилазы *E. P. canescens* увеличит выход целевых ферментов, способных значительно снизить вязкость НПС и увеличить усвояемость питательных веществ корма, снизив тем самым стоимость конечного продукта.

Техническая задача, на решение которой направлено данное изобретение, состоит в получении комплексных ФП на основе новых штаммов *P. verruculosum* серии PhyXyl, содержащих гетерологичные гены с увеличенной экспрессией:

Штамм *P. verruculosum* PhyXyl-41 - (ВКМ-4896D) - продуцент гетерологичных фитазы *A. niger*, относящейся к мио-инозит-гексакисфосфат-3(6)фосфогидролазам, (КФ 3.1.3.8, мол. масса 63 кДа) и эндо-1,4-β-ксилазы *E. P. canescens*, относящаяся к 10-й семье

гликозид-гидролаз (КФ 3.2.1.8, мол. масса 40 кДа) для применения в кормопроизводстве в качестве кормовой добавки для улучшения усвояемости питательных веществ кормов, содержащих зерновые и зернобобовые культуры, пшеничные отруби и шроты за счёт снижения вязкости кормов за счёт деструкции ксиланов и разложения фитатов.

5 **Технический результат** от предлагаемого изобретения состоит в улучшении усвояемости питательных веществ кормов, снижении вязкости кормов, содержащих НПС злаков и повышении кормовой ценности рационов для сельскохозяйственных моногастричных животных и птицы при обработке корма новым комплексным ФП, содержащим сочетание высокоактивных ферментов как фитазу А *A.niger*, эндо-1,4-β-ксилаказы Е *P.canescens* и комплекс сопутствующих карбогидраз *P.verruculosum*.

10 **Методы определения активности ферментов.** В предлагаемом изобретении метод определения фитазной активности основан на скорости образования свободного фосфата при гидролизе фитата Na (из риса). Для определения фитазной активности используют 1,4 мМ раствор фитата Na в 0,1 М Na-ацетатном буфере, рН 5,0. Раствор субстрата (300 мкл) смешивают с 33 мкл раствора фермента и инкубируют 30 мин при 15 37°C. Реакцию останавливают добавлением 335 мкл 10%-ного раствора ТХУ (трихлоруксусной кислоты). Концентрацию свободного фосфата (Pi) определяют с помощью аммоний-молибденового реагента (13 мМ FeSO₄*7H₂O/ 8,1 мМ (NH₄)₆Mo₂O₂₄*4H₂O/0,533 М H₂SO₄). Реакционную смесь инкубируют с 665 мкл 20 свежеприготовленного реагента в течение 30 мин при комнатной температуре. Светопоглощение измеряют при 750 нм. Концентрацию Pi определяют исходя из калибровочного графика, полученного с помощью KН₂PO₄ (0-0,2 г/л). За единицу активности принимают количество фермента, способного высвободить 1 мкмоль Pi в 25 1 мин [Engelen, A.J., van der Heeft, F., Randsdorp, P.H., and Smit, E.L. (1994) J. AOAC Int., 77, 760-764.].

Для определения ксиланазной активности используют метод, основанный на измерении скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС) методом Шомоди-Нельсона при гидролизе полисахаридного субстрата - ксилана из древесины бука. За 30 единицу активности принимают такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль ВС в минуту при рН 5,0 и 50°C [Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.А. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. - М.: МГУ, 1995. - 144 с].

35 **Сущность изобретения** заключается в получении нового штамма-продуцента *P.verruculosum*:

Изобретение заключается в получении нового штамма-продуцента *P.verruculosum* PhyXyl-41 - (ВКМ-4896D), который обеспечивает получение ФП комплексного действия, включающего высокоактивную гетерологичную фитазу А *A.niger* и эндо-1,4-β-ксилаказу Е *P.canescens* и комплекс сопутствующих карбогидраз *P.verruculosum*. Активность фитазы в КЖ после окончания ферментации в лабораторных ферментёрах составляет 1900 ед/ 40 мл по фитату натрия (рН 5,0, 40°C) и 900 ед/мл по ксилану (рН 5,0, 50°C). Комплекс сопутствующих карбогидраз представлен целлобиогидролазой I, целлобиогидролазой II и β-глюкозидазой.

Способ получения ФП предусматривает глубинное культивирование штамма - 45 продуцента *P.verruculosum* PhyXyl-41 - (ВКМ-4896D) на питательной среде, содержащей МКЦ, пшеничные отруби и кукурузный экстракт, глюкозу и соли с последующей распылительной сушкой КЖ и получении сухого ФП со стандартизованными до 5000 ед/г фитазной и до 3000 ед/г ксиланазной активностями. Применение нового

комплексного ФП позволит повысить кормовую ценность рационов на основе зерновых и зернобобовых культур.

Изобретение реализуется следующим образом.

Штамм *P. verruculosum* PhyXyl-41 - (ВКМ-4896D) получают из исходного штамма *P. verruculosum* PV2007(ВКМ F-3972D) путем котрансформации плазмидами pCBHI-PhyAsp, pCBHI-XylE и pSTA10 с последующей селекцией на агаризованной среде с 10 mM NaNO₃. Получение плазмиды pCBHI-XylE описано в патенте RU 2653429.

Штамм *P. verruculosum* PhyXyl-41 - (ВКМ-4896D) характеризуется теми же культурально-морфологическими признаками, что и описанные выше для штамма *P. verruculosum* PhyEG-76 - (ВКМ-4895D).

Штамм *P. verruculosum* PhyXyl-41 - (ВКМ-4896D) отличается от исходного штамма повышенной продукцией фитазы А *A. niger* и неингибируемой белковыми ингибиторами злаков эндо-1,4-β-ксилаказы Е *P. canescens*

Новый комплексный ФП, полученный с помощью штамма *P. verruculosum* PhyXyl-41 - (ВКМ-4896D) обладает улучшенными эксплуатационными характеристиками, что обусловлено наличием в его составе фитазы А *A. niger*, эндо-1,4-β-ксилаказы Е *P. canescens* и сопутствующих ферментов целлюлазного комплекса *P. verruculosum*, что является отличием данного ФП в сравнении с имеющимися на рынке коммерческими аналогами.

Возможность использования изобретения иллюстрируется примерами, которые не ограничивают объем и сущность притязаний, связанных с ними.

Пример 1. Получение рекомбинантного штамма *P. verruculosum* PhyXyl-41 - (ВКМ-4896D).

Реципиентный штамм *P. verruculosum* PV2007 одновременно трансформируют плазмидами pCBHI-PhyAsp и pCBHI-XylE, совместно с плазмидой pSTA10 в соотношении 3:1 (мкг каждой ДНК) по стандартной методике [*Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.; A. Y. Aleksenko, N. A. Makarova, I. V. Nikolaev, A. J. Clutterbuck, Integrative and replicative transformation of Penicillium canescens with a heterologous nitrate-reductase gene, Curr. Genet. 28 (1995) 474-478*]. В результате трансформации получают более 100 рекомбинантных штаммов (клонов) серии *P. verruculosum* PhyXyl, из которых в результате первичного скрининга при культивировании в качалочных колбах на стандартной питательной среде отобрано 10 клонов, обладающих высокой фитазной и ксиланазной активностями. Стандартная среда культивирования имела следующий состав (г/л): МКЦ- 40, пшеничные отруби-10, дрожжевой экстракт- 10, КН₂РО₄- 15, (NH₄)₂SO₄- 5, MgSO₄×7H₂O- 0,3, СаCl₂×2H₂O- 0,3.

Фитазная активность в КЖ отобранных при культивировании в качалочных колбах клонов серии PhyXyl варьирует от 100 до 400 ед/мл, а ксиланазная - от 30 до 450 ед/мл. Для дальнейших испытаний отобран клон PhyXyl-41, отличающийся наибольшими целевыми активностями по сравнению с исходным штаммом и другими рекомбинантными штаммами.

Пример 2. Культивирование штамма *P. verruculosum* PhyXyl-41 - (ВКМ-4896D) в ферментёре, получение сухого ФП PhyXyl-41 и его *in vitro* кормовые испытания.

Культивирование штамма *P. verruculosum* PhyXyl-41 - (ВКМ-4896D) проводят в ферментере объемом 3 л, оснащённом барботером для подачи воздуха в аппарат и турбинной мешалкой на среде 1 следующего состава:

Среда 1 (г/л):

Глюкоза - 40

МКЦ - 40

Кукурузный экстракт - 25

Пшеничные отруби - 10

KH_2PO_4 - 7

5 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 5

CaCl_2 - 0,3

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3

10 Культивирование проводят 144 ч, при pH 4,5-5,0 и 32°C. Образцы КЖ отбирают каждые сутки, начиная с 72 ч культивирования, центрифугируют и измеряют фитазную и ксиланазную активности. В конце ферментации в КЖ активность фитазы составляет 1900 ед/мл, ксиланазы - 900 ед/мл.

15 По окончании ферментации грибную биомассу удаляют путём центрифугирования (4000 об/мин в течение 20 мин на центрифуге Avanti JXN-26, «Beckman coulter», США), свободную от клеток КЖ концентрируют с помощью ультрафильтрации (с пределом отсечения 10 кДа), ультраконцентрат сушат на распылительной сушилке (Buchi MiniSpray Dryer B-290, «BUCHI Labortechnik», Швейцария, $T_{\text{вх}}=135^\circ\text{C}$, $T_{\text{вых}}=55-65^\circ\text{C}$, степень аспирации=70%, скорость потока 0,5 л КЖ в час) с получением сухого ФП, который представляет собой светло-бежевый легко растворимый в водной среде порошок.

20 Таким образом, получают сухой ФП PhyXyl-41 с фитазной активностью 31200 ед/г и ксиланазной активностью 19000 ед/г.

25 Сухой ФП PhyXyl-41 разбавляют (стандартизируют) кукурузной мукой до 5000 ед/г по фитазной и до 3044 ед/г ксиланазной активности. Разбавленная форма сухого ФП PhyXyl-41 является его конечной формой, которую далее подвергают кормовым испытаниям *in vitro*. Фитазный ФП Natuphos E 10000, не имеющий никаких дополнительных, кроме фитазной, активностей, используют в роли внутреннего стандарта.

30 Данные результатов *in vitro* испытаний ФП PhyXyl-41 и Natuphos E 10000 приведены в таблице 1. Очевидно, что PhyXyl-41 превосходит ФП Natuphos E 10000 по способности гидролизовать фитин, входящий в состав соевой муки в широком диапазоне значений pH. Так, PhyXyl-41 при равной дозировке по фитазной активности при обработке соевой муки обеспечивает при pH 3 в 1,4-2 раза, при pH 5 - в 1,3 раза, при pH 7 - 1,2-2 раза более высокий выход Pi, чем ФП Natuphos E 10000. Таким образом, можно утверждать, что ФП PhyXyl-41 может быть использован в качестве эффективной кормовой добавки.

35

Таблица 1. Результаты *in vitro* кормовых испытаний ферментного препарата PhyXyl-41.

| Ферментный препарат | Дозировка, ед. фитазной активности на 1 г соевой муки | Выход фосфат-ионов (Pi), % | | |
|---------------------|---|----------------------------|------|------|
| | | pH 3 | pH 5 | pH 7 |
| PhyXyl-41 | 75 | 32 | 40 | 12 |
| | 100 | 40 | 46 | 14 |
| | 150 | 58 | 65 | 18 |
| Natuphos E 10000 | 75 | 23 | 31 | 6 |
| | 100 | 27 | 35 | 8 |
| | 150 | 29 | 49 | 15 |

45

(57) Формула изобретения

1. Рекомбинантный штамм *Penicillium verruculosum* PhyXyl-41, депонированный во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером ВКМ F-4896D, предназначенный для продукции гетерологичных высокоактивной фитазы *A Aspergillus*

niger и неингибируемой эндо-1,4- β -ксилаказы E *Penicillium canescens*.

2. Способ получения ферментного препарата PhyXyl-41, полученного на основе рекомбинантного штамма *Penicillium verruculosum* PhyXyl-41 по п.1, при выращивании на ферментационной среде, обеспечивающий получение ферментного препарата

5 комплексного действия, включающего гетерологичные высокоактивную фитазу А *Aspergillus niger* и неингибируемую эндо-1,4- β -ксилаказу E *Penicillium canescens*, а также комплекс сопутствующих карбогидраз *Penicillium verruculosum*, представленный целлобиогидролазой I, целлобиогидролазой II и β -глюкозидазой, и состоящий в

10 культивировании рекомбинантного штамма по п.1, на ферментационной среде, состоящей из (г/л): глюкоза - 40, микрокристаллическая целлюлоза - 40, кукурузный экстракт - 25, пшеничные отруби - 10, дигидрофосфат калия - 7, сульфат аммония - 5, хлорид кальция - 0,3, семиводный сульфат магния - 0,3.

15

20

25

30

35

40

45