

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.21

**ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА TACA  
НА ТРАНСКРИПЦИЮ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *CBHI* В ШТАММЕ  
МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM***

**Андрей Михайлович Чулкин<sup>1</sup>, Валерий Юрьевич Кислицин<sup>2</sup>, Иван  
Никитич Зоров<sup>3</sup>, Игорь Александрович Шашков<sup>4</sup>, Александра Михайловна  
Рожкова<sup>5</sup>**

<sup>1, 2, 4, 5</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва,  
Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химиче-  
ский факультет, Москва, Россия

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

**Аннотация.** Ген *tacA*, кодирующий белок-репрессор Taca, был клонирован ме-  
тодом «прогулки по неклонированной ДНК» из геномной ДНК гриба *Penicilli-  
um verruculosum* В1-221-151. Нокаут генов *tacA* и *niaD* методом CRISPR/CAS9  
привел к получению нового штамма-реципиента *P. verruculosum*  $\Delta$ niaD $\Delta$ tacA,  
характеризующегося более высокой скоростью биосинтеза внеклеточного белка.  
Анализ транскрипции и экспрессии гена *cbhI* в исходном штамме *P. verruculosum*  
В1-221-151 и в штамме *P. verruculosum*  $\Delta$ niaD $\Delta$ tacA показал резкий рост уровня  
транскрипции гена *cbhI* уже через 2 ч после начала индукции целлобиозой, целло-  
триозой, гентиобиозой и смесью ди- и трисахаридов по сравнению с транскрип-  
цией гена *cbhI* в исходном штамме. Удельная активность целлюбогидролазы I,  
основного фермента целлюлолитического комплекса гриба *P. verruculosum*, через  
96 ч ферментации штамма  $\Delta$ tacA увеличилась в 3 раза по сравнению с исходным  
штаммом.

**Ключевые слова:** транскрипционный фактор, CRISPR/CAS9, целлюбогидро-  
лаза I

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-2-121-129

**Список сокращений:** ЦБГ – целлюбогидролаза I, ФП – ферментный препарат,  
МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза, ТФ- транскрипционный фактор.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фон-  
да (проект № 22-24-00997).

**Для цитирования:** Чулкин А.М., Кислицин В.Ю., Зоров И.Н., Шашков И.А. Рож-  
кова А.М. Влияние нокаута транскрипционного фактора Taca на транскрипцию  
и экспрессию гена *cbhI* в штамме мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* //  
Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 64. № 2. С. 121–129.

## ORIGINAL ARTICLE

**INFLUENCE OF THE TACA TRANSCRIPTION FACTOR KNOCKOUT ON THE TRANSCRIPTION AND EXPRESSION OF THE *CBHI* GENE IN THE *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* STRAIN****Andrey M. Chulkin<sup>1</sup>, Valeriy Yu. Kislitsin<sup>2</sup>, Ivan N. Zorov<sup>3</sup>, Igor A. Shashkov<sup>4</sup>, Aleksandra M. Rozhkova<sup>5</sup>**

<sup>1, 2, 4, 5</sup> Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation  
<sup>3</sup> Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

**Corresponding author:** Alexandra Mikhailovna Rozhkova, amrojkova@yahoo.com

**Annotation.** The *tacA* gene, encoding the TacA repressor protein, was cloned by “walking the uncloned DNA” method from the genomic DNA of the fungus *Penicillium verruculosum* B1-221-151. Knockout of the *tacA* and *niaD* genes by the CRISPR/CAS9 led to the production of a new host strain *P. verruculosum*  $\Delta$ niaD $\Delta$ tacA, characterized by a higher rate of extracellular protein biosynthesis. Analysis of the transcription and expression of the *cbhI* gene in the original *P. verruculosum* B1-221-151 strain and in the *P. verruculosum*  $\Delta$ niaD $\Delta$ tacA strain showed a sharp increase in the level of *cbhI* gene transcription 2 h after the start of induction with cellobiose, cellotriose, gentiobiose, and a mixture of di- and tri-saccharides in comparison with the transcription of the *cbhI* gene in the original strain. The specific activity of cellobiohydrolase I, the main enzyme of the cellulolytic complex of the fungus *P. verruculosum*, by 96 h of fermentation of the  $\Delta$ tacA strain increased 3 times compared to the original strain.

**Keywords:** transcription, CRISPR/CAS9, cellobiohydrolase I**Financial Support.** The work was supported by Russian Science Fund (Grant #22-24-00997).**For citation:** Chulkin A.M., Kislitsin V.Yu., Zorov I.N., Shashkov I.A., Rozhkova A.M. Influence of the TacA transcription factor knockout on the transcription and expression of the *cbhI* gene in the *Penicillium verruculosum* strain // Vestn. Moscow. un-ta. Ser. 2. Chemistry. T. 64. № 2. P. 121–129.

Экспрессия гидролитических ферментов, разрушающих клеточные стенки растений, в мицелиальных грибах регулируется на уровне транскрипции посредством транскрипционных факторов (ТФ). В настоящее время изучены механизмы регуляции генов, кодирующих целлюлазы и гемицеллюлазы в мицелиальных грибах родов *Aspergillus* spp. [1, 2], *Trichoderma* spp. [3], *Neuspora crassa* [4] и др. Показано, что транскрипция грибных генов карбогидраз контролируется несколькими регуляторами транскрипции, большинство из которых относятся к семейству транскрипционных факторов Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> [5]. Эти регуляторы реагируют на моно-, ди- и олигосахариды (СП 3–6), которые действуют как индукторы [6].

Транскрипционные факторы могут осуществлять как позитивную, так и негативную регуляцию экспрессии ферментов [7]. Примером положительного регулятора служит ТФ XlnR, который активирует экспрессию генов, кодирующих ксиланазы и целлюлазы, гидролизующие наиболее распространенные в природе полисахариды [2, 8–10].

В мицелиальных грибах наряду с позитивной возможна и негативная регуляция транскрипции, которая реализуется через механизм углеродной катаболитной репрессии и осуществляется посредством белков-репрессоров [7]. Углеродная катаболитная репрессия позволяет организмам осуществлять последовательную утилизацию источников углерода, начиная с более предпочтительных (быстро утилизируемых и

энергетически выгодных). Наиболее изученным белком-репрессором является CreA [11–13], однако существуют и другие негативные транскрипционные факторы, например AceI в *Trichoderma reesei* [14], или его ортологи в других грибах [15].

Таким образом, сверхэкспрессия активаторов, или делеция репрессоров, представляет собой эффективный способ усиления экспрессии целлюлаз/гемицеллюлаз в мицелиальных грибах – продуцентах гидролитических комплексов ферментов [16–17].

Мицелиальный гриб *Penicillium verruculosum* является промышленным продуцентом целлюлолитического комплекса ферментов с продуктивностью до 60 г/л общего секретируемого белка [18]. Целлюлолитический комплекс *P. verruculosum* представлен целлюлогидролазой I (ЦБГ), эндоглюканазой II и β-глюкозидазой, которые совместно эффективно гидролизуют микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ). Наиболее важен, с точки зрения гидролиза, фермент ЦБГ, осуществляющий гидролиз кристаллических участков МКЦ, поэтому увеличение экспрессии ЦБГ в составе секретируемого комплекса гриба *P. verruculosum* представляет собой актуальную практическую задачу.

Недавно нами для геномного редактирования гриба *P. verruculosum* был адаптирован метод CRISPR/CAS9, что существенно расширило возможности коррекции генома этого гриба [19]. В нашей последней работе (в печати) с помощью методики CRISPR/CAS9 была исследована функция транскрипционного активатора XlnR, который оказывает воздействие на экспрессию ксиланаз и частично участвует в транскрипции гена *cbhI*, кодирующего целлюлогидролазу I *P. verruculosum*.

В настоящем исследовании ранее адаптированная методика геномного редактирования CRISPR/CAS9 применена для нокаута гена *tacA*, кодирующего белок-репрессор TacA.

Цель настоящей работы состояла в анализе транскрипции/экспрессии гена *cbhI* в условиях индукции ранее подобранными моно- и ди-сахарами, что необходимо для понимания механизма регуляции транскрипции генов в грибе *P. verruculosum*.

### Экспериментальная часть

**Клонирование гена *tacA*, кодирующего транскрипционный фактор TacA *P. verruculosum*.** Нуклеотидную последовательность гена *tacA* штамма Y-94 гриба *Talaromyces pinophilus* (LC012352.1) мы соотнесли с восемью бли-

жайшими гомологами, используя для поиска коллекцию «whole genome shotgun contigs» и программу «Blastn» (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn>) для грибов из родов *Talaromyces* и *Penicillium*. На консервативные участки кодирующей области гена были синтезированы вырожденные праймеры:

```
PVtacAD tcctcttcaaatgtctgccagaa(g/a)ca;  
PVtacAR tcatgtcggcactcggagg(t/a)tg.
```

С помощью праймеров PVtacAD, PVtacAR, и ДНК *P. verruculosum* в качестве матрицы был амплифицирован фрагмент ДНК, соответствующий последовательности внутреннего фрагмента гена *tacA P. verruculosum*.

Клонирования фланкирующих 5'- и 3'-областей гена осуществлено с использованием метода «прогулки по неклонированной геномной ДНК» [20], для чего на секвенированную последовательность ПЦР-фрагмента были разработаны праймеры:

```
TACCD1 gactttcaactcttcccgtctgccgatctc;  
TACCD2 agtctggatcctgttctcattcgcagacc;  
TACCR1 gggtgaggtttggagaagagtgaggaggag;  
TACCR2 aagggaaagacatacgtggttggtggtgtg.
```

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для клонирования проводили с использованием ДНК-полимеразы Phire Hot Start II DNA Polymerase («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Все праймеры были разработаны с помощью программного обеспечения SnapGene v. 3.2.1.

Анализ полученной нуклеотидной последовательности позволил определить места начала и терминации трансляции транскрипционного фактора TacA *P. verruculosum*, а также выявить наличие одного интрона в кодирующей области гена.

Анализ транслированной последовательности показал наличие участка, кодирующего «цинковый палец» класса Cys2His2 Zn(II) (рис. 1), присутствующий во многих транскрипционных факторах эукариот [21].

**Нокаут гена *tacA* в исходном штамме *P. verruculosum* B1-221-151.** Нокаут гена *tacA* проводили адаптированным методом CRISPR/CAS9 по методике, описанной в [19].

Последовательность протоспейсера для нокаута гена *tacA* (5'-tttgaagaggacaataggga-3') была подобрана в программе ChopChop

(<https://chopchop.cbu.uib.no/>). Плазмида pGCT (рис. 2) получена путем лигирования по рестрикционным сайтам *Bam*HI и *Sal*I в плазмиду pGpdCas9 [19] фрагмента ДНК, кодирующего sgРНК для гена *tacA*.

$tacA_{sgR^-}$     *tcctattgtcctcttcaagctattcgtccttcat*  
                   *асаасаг*  
 $tacA_{sgR^+}$     *tttgaagaggacaataggagtttagagctag*  
                   *ааатгасаг*

**Трансформация исходного штамма *P. verruculosum* B1-221-151 и отбор рекомбинантных штаммов *P. verruculosum niaDΔtacA*.** Для одновременного нокаута генов *niaD* и *tacA* проводили трансформацию штамма *P. ver-*

*ruculosum* B1-221-151 плазмидами p5SniaD и pGCT (рис. 2) по описанной ранее методике [19, 22]. Трансформанты с генотипом *P. verruculosum ΔniaD* отбирали на селективной среде (СМ) с добавлением 0,7 М NaClO<sub>3</sub> в качестве селективного агента и 10 мМ NH<sub>4</sub>Cl в качестве источника азота. Колонии, выросшие на данной среде, переседали на минимальную среду (ММ) с NH<sub>4</sub>Cl или NaNO<sub>3</sub> в качестве источника азота. Клоны, растущие на среде с NaNO<sub>3</sub>, исключались из дальнейшего анализа.

Из отобранных на селективной среде клонов выделяли геномную ДНК набором DNeasy Plant Mini Kit («Qiagen», США). Выделенную ДНК

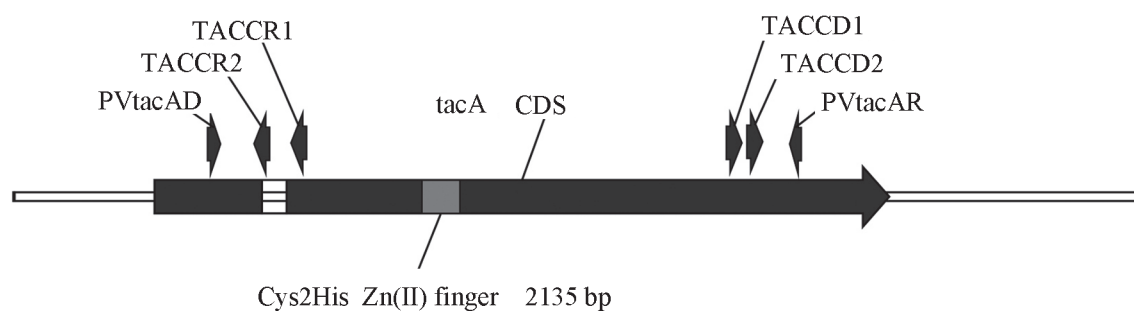


Рис. 1. Карта гена *tacA* *P. verruculosum*. Показаны экзон-интронная структура, расположение праймеров для ПЦР и секвенирования, а также положение домена Cys2His2Zn(II)

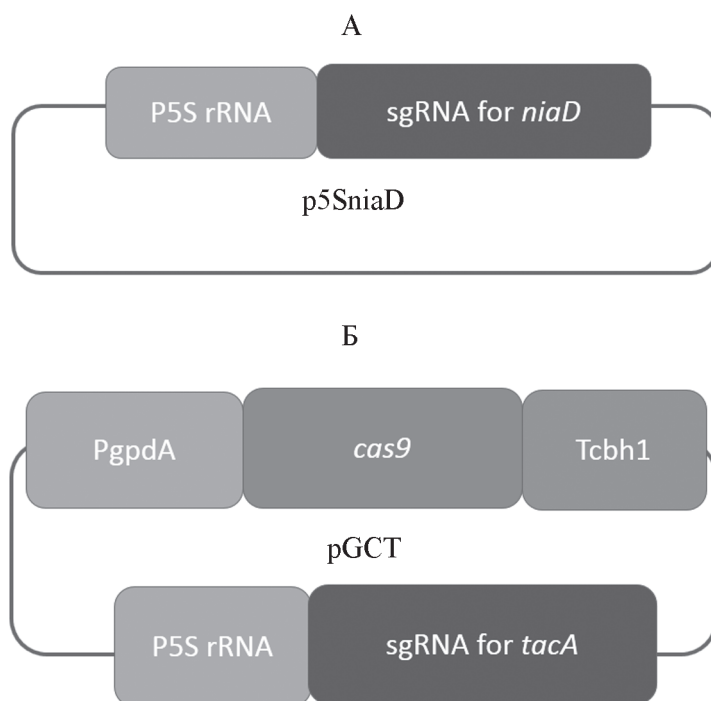


Рис. 2. Схема плазмид p5SniaD (А) и pGCT (Б)

использовали для амплификации фрагментов гена *tacA* с помощью праймеров:

tacAF1                    acgagccaatcagcgctaaaggc;  
TACCR1                ggttgaggttttgagaagagtggaggag.

Полученные фрагменты ДНК использовали для секвенирования и поиска мутаций.

**Определение влияния индукторов на транскрипцию гена *cbhI* методом количественной ПЦР.** Выращивание биомассы штаммов *P. verruculosum*  $\Delta$ niaD $\Delta$ tacA и *P. verruculosum* B1-221-151 для выделения РНК в условиях индукции проводили так, как было описано ранее [22], за исключением использования хлорида аммония в концентрации 10 мМ в качестве источника азота для штамма с генотипом  $\Delta$ niaD $\Delta$ tacA.

В качестве индукторов использовали 2 мМ ксилозы, 1 мМ ксилобиозы, 2 мМ целлобиозы, 2 мМ целлотриозы, 2 мМ гентиобиозы, 2 мМ целлоолигосахаридов (ЦОС) со степенью полимеризации 2–3 и 2 мМ ксилоолигосахаридов (КОС) со степенью полимеризации 3–5. ЦОС и КОС были получены путем ограниченного ферментативного гидролиза МКЦ и ксилана березы, как описано ранее [23]. Пробы мицелия отбирали через 1, 2, 4 ч. Выделение РНК и количественную ПЦР проводили, как описано в [23].

Все пробы наносили в трех повторностях. Для сравнения *Sq* в различных плашках, 43 нг ДНК *P. verruculosum* в трех повторностях наносили в каждую плашку для пересекающихся генов в качестве матрицы.

Программа ПЦР в реальном времени: 1 стадия – 5 мин при 95 °С, 2 стадия – 15 с при 95 °С, 45 с при 60 °С, 39 циклов с измерением флуоресценции после каждого цикла.

Амплификацию проводили на приборе «CFX96» («Bio-Rad», США) в совместимых 96-луночных белых низкопрофильных планшетах. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager v.3.1.

**Ферментация штаммов *P. verruculosum*  $\Delta$ niaD $\Delta$ tacA и *P. verruculosum* B1-221-151.** Штаммы *P. verruculosum*  $\Delta$ niaD $\Delta$ tacA и *P. verruculosum* B1-221-151 культивировали в ферментерах объемом 3 л («Проинтех», Россия) на среде, содержащей (г/л):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 7,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 5,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,23; глюкозную патоку – 57,0; дрожжевой экстракт – 10,0; пшеничные отруби – 10,0; МКЦ – 40,0. Культивирование проводили при 30 °С и pH 4,8–5,0 в течение 6 суток. В культуральной жидкости опре-

деляли концентрацию белка по методу Лоури, используя в качестве стандарта БСА [24].

**Определение активности целлобиогидролазы I.** За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль продукта за 1 мин. Активность по отношению к микрокристаллической целлюлозе (авицеллу, концентрация 5 г/л в реакционной смеси) определяли по начальным скоростям образования восстанавливающих сахаров (ВС) при pH 5,0 и 50 °С методом Шомоди–Нельсона [25].

## Результаты и обсуждение

**Нокаут гена транскрипционного фактора *TacA* с использованием CRISPR/CAS9.** Нокаут гена *tacA* был получен с использованием адаптированной методики на основе технологии геномного редактирования CRISPR/CAS [19]. Для этого прототрофный штамм *P. verruculosum* B1-221-151 трансформировался плазмидой pGCT вместе с плазмидой p5SniaD (рис. 2). В результате трансформации, на селективной среде с хлоратом натрия и хлоридом аммония было отобрано 16 трансформантов, из которых 11 были не способны утилизировать нитрат в качестве источника азота. Из четырех случайных клонов была выделена геномная ДНК, использованная для амплификации и секвенирования фрагмента гена *tacA*. В результате секвенирования было установлено, что 1 из 4 проверенных клонов имел мутацию в месте двухцепочечного разрыва ДНК нуклеазой Cas9, которая привела к сдвигу рамки считывания (рис. 3). Для последующих экспериментов был отобран клон № 10 с генотипом  $\Delta$ niaD $\Delta$ tacA.

**Анализ транскрипции и экспрессии гена *cbhI* в штаммах *P. verruculosum* B1-221-151 и *P. verruculosum*  $\Delta$ niaD $\Delta$ tacA под влиянием различных индукторов.** Нами было проведено исследование влияния нового путативного транскрипционного фактора *TacA* на транскрипцию и экспрессию гена *cbhI* в исходном штамме B1-221-151 и штамме с нокаутом гена *tacA* ( $\Delta$ tacA). Анализ транскрипции гена *cbhI* проводили методом количественной ПЦР в присутствии ранее установленных индукторов транскрипции гена *cbhI* для исходного штамма *P. verruculosum* B1-221-151 [22] (рис. 4).

Из рис. 4, а следует, что в штаммах с нокаутом гена *tacA* наблюдается резкий рост уровня транскрипции гена *cbhI* уже через 2 ч после начала индукции целлобиозой, целлотриозой,

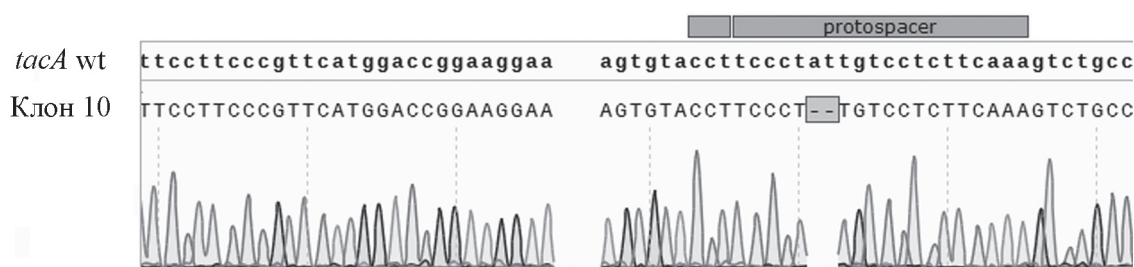


Рис. 3. Выравнивание фрагментов гена *tacA*, содержащих мутации в районе протоспейсера у клона 10, отобранного после трансформации плазмидой pGCT

смесью ЦОС (в основном ди- и трисахариды), а также гентиобиозой (1,6- $\Delta$ -дисахарид) по сравнению с транскрипцией гена *cbhI* в исходном штамме. Наибольшее увеличение транскрипции *cbhI* наблюдается при индукции целлобиозой через 2 ч, что характерно для *P. verruculosum* [22]. Динамика увеличения транскрипции гена *cbhI* в штамме  $\Delta tacA$  при воздействии разных индукторов различна. В случае индукции целлобиозой, целлотриозой и гентиобиозой максимальная транскрипция наблюдается через 2 ч, а через 4 ч уровень транскрипции падает. При индукции штаммов смесью ЦОС наблюдается небольшое увеличение транскрипции гена *cbhI* после 4 ч индукции. Вероятно, это связано с образованием дополнительной целлобиозы из смеси ЦОС, в которой присутствует незначительное количество примесей целлоолигосахаридов, имеющих степень полимеризации от 4 до 6, под действием собственного комплекса целлюлолитических ферментов.

Полученные данные свидетельствуют о негативном влиянии ТФ TасА на транскрипцию гена *cbhI*, что согласуется с данными по сравнению аминокислотных последовательностей TасА и его ортолога AceI – репрессора транскрипции целлюлаз в *Trichoderma reesei* [14]. Интересно отметить, что для другого гриба-целлюлолитика, *Talaromyces cellulolyticus*, делеция ТФ TасА приводит, наоборот, к снижению уровня транскрипции целлюлаз и ксиланаз [15]. Однако, по мнению авторов статьи, в регуляции транскрипции гидролитических ферментов у *T. cellulolyticus* участвует комплекс различных ТФ, часть из которых еще не изучена.

Ксилоолигосахариды, ксилобиоза и ксилоза практически не индуцируют транскрипцию гена *cbhI* ни в исходном В1-221-151, ни в нокаутированном  $\Delta tacA$  штаммах (рис. 4, б). В случае ин-

дукции ксилобиозой через 2 ч наблюдается незначительное повышение транскрипции *cbhI* в штамме  $\Delta tacA$ , однако значения относительной нормализованной экспрессии малы по сравнению со значениями при индукции целлосахарами (рис. 4, а).

Для изучения экспрессии ЦБГ в динамике была проведена ферментация штаммов В1-221-151 и  $\Delta tacA$  с использованием лабораторных ферментеров 1-L в стандартных условиях культивирования при контроле температуры, рН и  $pO_2$ .

На рис. 5 отражены изменения в динамике прироста белка (рис. 5, а) и авицеллазной активности (рис. 5, б) в течение 6 суток с отбором контрольных образцов культуральной жидкости через 48, 72, 96, 120 и 144 ч после начала ферментации. Из рис. 5, а следует, что максимальная концентрация белка (26 мг/мл) достигается через 96 ч после начала ферментации в случае штамма  $\Delta tacA$ , в то время как штамм В1-221-151 секретирует 22 мг/мл общего белка лишь после 144 ч.

Наиболее важный результат состоит в резком увеличении удельной активности ЦБГ, определенной по нерастворимому авицеллу (МКЦ), после 96 ч ферментации штамма  $\Delta tacA$  (рис. 5, б). Значения удельной активности ЦБГ в культуральной жидкости штаммов В1-221-151 и  $\Delta tacA$  различаются почти в 3 раза. Уменьшение авицеллазной активности в штамме  $\Delta tacA$  после 144 ч ферментации может быть связано с протеолитическим отщеплением целлюлозосвязывающего домена от ЦБГ, что приводит к частичной потере сродства ЦБГ к субстрату.

Таким образом, в результате нокаута гена *tacA*, кодирующего белок-репрессор TасА, удалось получить новый штамм-реципиент *P. verruculosum*  $\Delta niaD\Delta tacA$ , характеризующийся более высокой

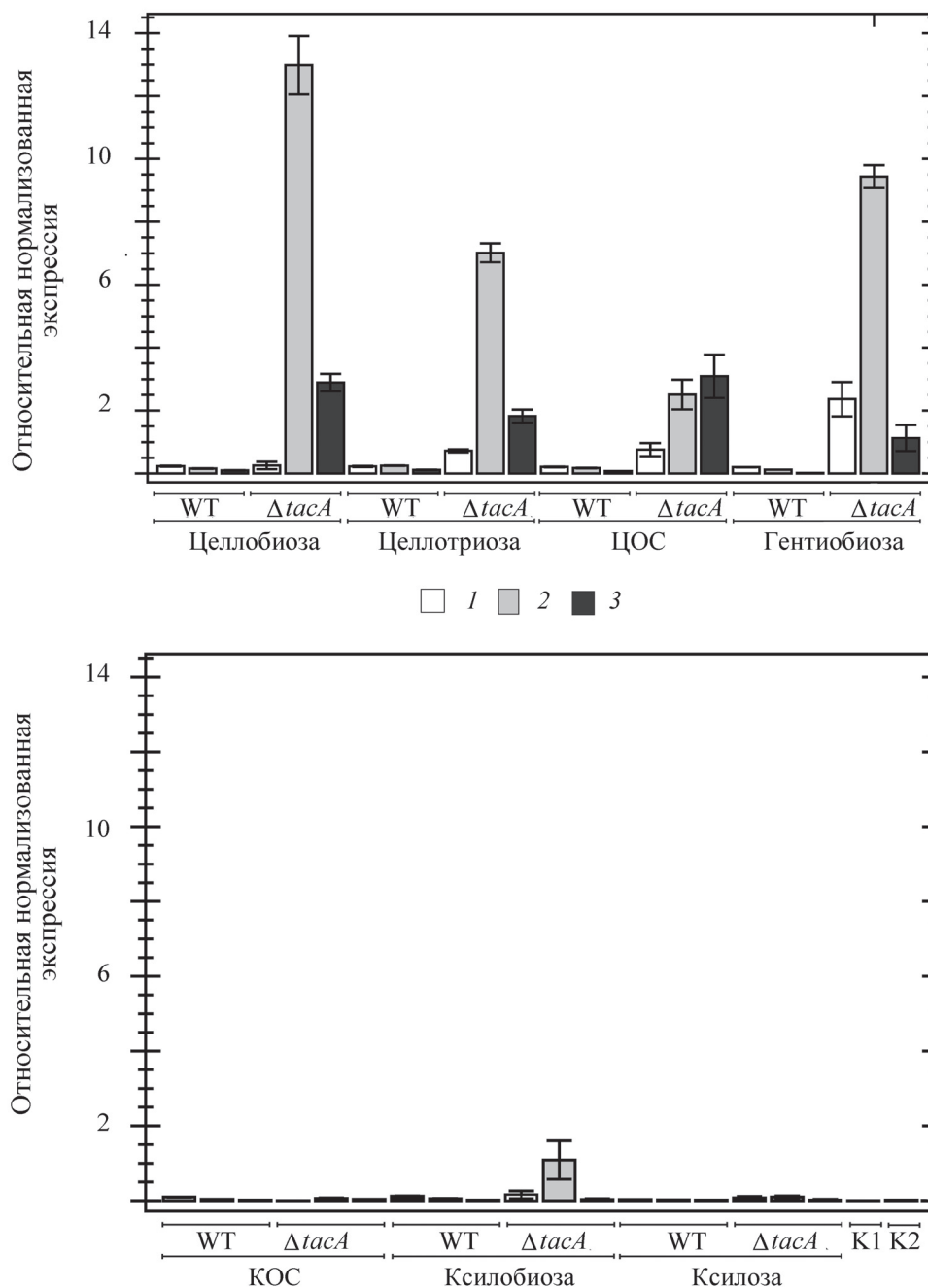


Рис. 4. Транскрипция гена *cbhI* в штаммах *P. verruculosum* B1-221-151 (WT, K1) и штамма *P. verruculosum*  $\Delta niaD\Delta tacA$  с нокаутированным транскрипционным фактором ( $\Delta tacA$ , K2) под влиянием различных индукторов: целлобиозы, целлотриозы, целлоолигосахаридов, гентиобиозы (А) и ксилоолигосахаридов, ксилобиозы, ксилозы (Б) через 1 ч (1), 2 ч (2), 4 ч (3) после добавления индуктора, а также без добавления индуктора через 1 ч (K1, K2)

скоростью роста и продукцией внеклеточного белка. Удельная активность целлобиогидролазы I после 96 ч ферментации штамма  $\Delta tacA$  увеличилась в 3 раза по сравнению с исходным штаммом. Полученный результат имеет существенное прак-

тическое значение, поскольку позволяет сократить сроки ферментации производственных штаммов *P. verruculosum* на двое суток, что в конечном счете должно привести к удешевлению технологии получения ферментных препаратов целлюлаз.

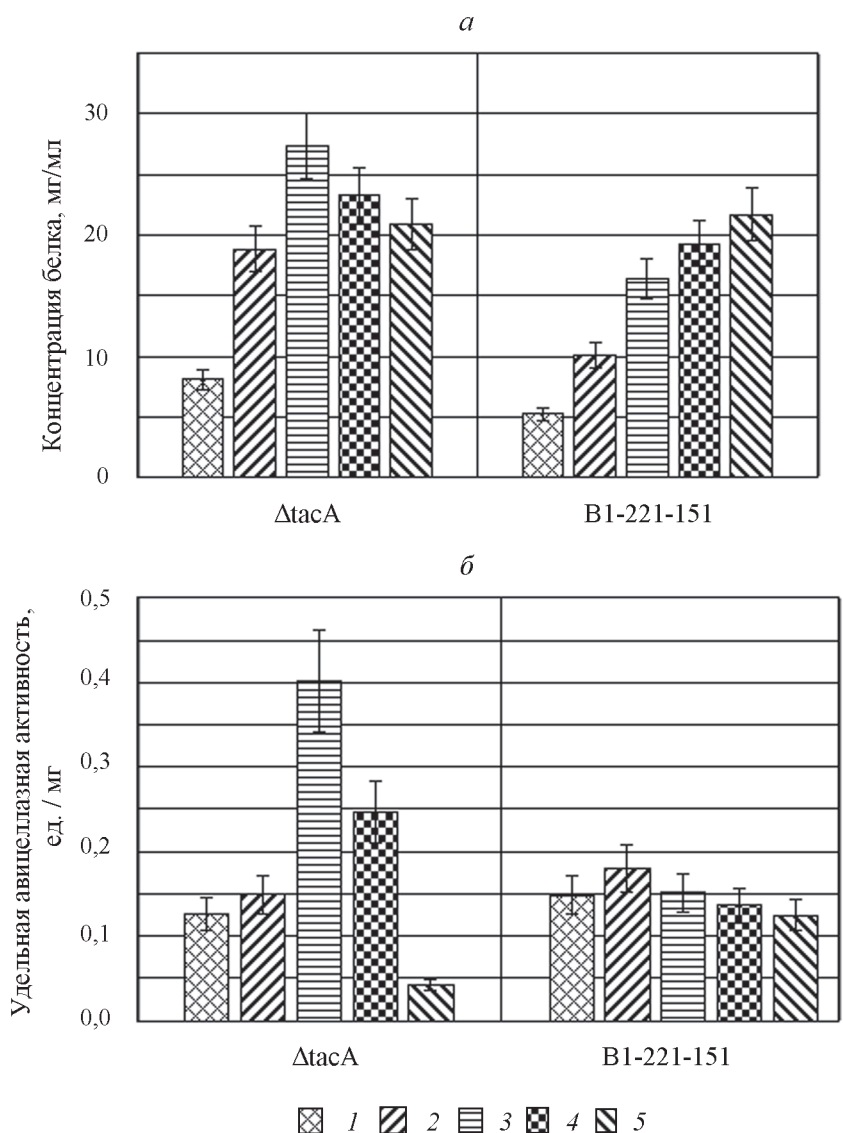


Рис. 5. Изменение концентрации общего секретируемого белка (а) и изменение удельной авицеллазной активности, измеренной по МКЦ (б), в процессе культивирования штаммов *P. verruculosum* B1-221-151 и *P. verruculosum*  $\Delta tacA$  с нокаутированным транскрипционным фактором ( $\Delta tacA$ ) при длительности ферментации, ч: 1 – 48, 2 – 72, 3 – 96, 4 – 120, 5 – 144

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Noguchi Y., et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. Vol. 85. P. 141–154 (DOI: 10.1007/s00253-009-2236-9).
- Van Peij N.N., Gielkens M.M., De Vries R.P., Visser J., de Graaff L.H. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. Vol. 64. P. 3615–3619.
- Stricker A.R., Mach R.M., de Graaff L.H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 78. P. 211–220 (DOI: 10.1007/s00253-007-1322-0).
- Coradetti S.T., Craig J.P., Xiong Y., Shock T., Tian C., Glass N.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. Vol. 109. P. 7397–7402 (DOI: 10.1073/pnas.1200785109).
- Todd R.B., Zhou M., Ohm R.A., Leeggangers H.A.C.F., Visser L., de Vries R.P. // BMC Genomics. 2014. Vol. 15. P. 214 (DOI: 10.1186/1471-2164-15-214).
- Kowalczyk J.E., Benoit I., de Vries R.P. // Adv. Appl. Microbiol. 2014. Vol. 88. P. 31–56 (DOI: 10.1016/B978-0-12-800260-5.00002-4).
- Li Z., Liu G., Qu Y. // Bioresource. Technology. 2017. Vol. 245. P. 1718–1726.
- Gielkens M.M., Dekkers E., Visser J., de Graaff L.H. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. Vol. 65. P. 4340–434.
- Battaglia E., Visser L., Nijssen A., van Veluw G.J., Wösten H.A.B., de Vries R.P. // Stud. Mycol. 2011. Vol. 69. P. 31–38. (DOI: 10.3114/sim.2011.69.03).



10. de Vries R.P., van den Broeck H.C., Dekkers E., Manzanares P., de Graaff L.H., Visser J. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. Vol. 65. P. 2453–2460.
11. Dowzer C.E., Kelly J.M. // *Current Genetics.* 1989. Vol. 15. P. 457–459.
12. Drysdale M.R., Kolze S.E., Kelly J.M. // *Gene.* 1993. Vol. 130. P. 241–245.
13. Ilmén M., Thrane C., Penttilä M. // *Molecular and General Genetics.* 1996. Vol. 251. P. 451–460.
14. Aro N., Ilmen M., Saloheimo A., Penttilä M. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. Vol. 69. P. 56–65. PMID: 12513977.
15. Fujii T., Inoue H., Ishikawa K. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2015. Vol. 175. P. 3218–3229.
16. Long C., Cheng Y., Cui J., Liu J., Gan L., Zeng B., Long M. // *Mol. Biotechnol.* 2018. Vol. 60. P. 55–61.
17. Ichinose S., Tanaka M., Shintani T., Gomi K. // *J. Biosci. Bioeng.* 2018. Vol. 125. P. 141–147.
18. Синицын А.П., Синицына О.А., Рожкова А.М. // *Биотехнология.* 2020. Т. 36. № 6. С. 24–41.
19. Kislitsin V.Y., Chulkin A.M., Zorov I.N. // *Biores. Technol. Rep.* 2022. Vol. 18. P. 1–8. (DOI: 10.1016/j.biteb.2022.101023).
20. Siebert P.D., Chenchik A., Kellogg D.E. // *Nucleic Acids Res.* 1995. Vol. 23. P. 1087–1088. (DOI: 10.1093/nar/23.6.1087).
21. Fedotova A.A., Bonchuk A.N., Mogila V.A., Georgiev P.G. // *Acta Naturae.* 2017. Vol. 9. N 2 P. 47–58. PMID: 28740726.
22. Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V., Clutterbuck A.J. // *Curr Genet.* 1995. 28 (5). P. 474–477 (DOI: 10.1007/BF0031081819).
23. Кислицин В.Ю., Чулкин А.М., Зоров И.Н. // *Биотехнология.* 2021. Т. 37. № 1. С. 45–53 (DOI: 10.21519/0234-2758-2021-37-1-45-53).
24. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. *Справочник биохимика* // М., 1991. С. 544.
25. Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.А. *Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов* // М., 1995. 144 с.
26. Pabo C.O., Peisach E., Grant R.A. // *Annu Rev Biochem.* 2001. Vol. 70. P. 313–40 (DOI: 10.1146/annurev.biochem.70.1.313).

### Информация об авторах

Чулкин Андрей Михайлович – науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. биол. наук, zcbml@yandex.ru;

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

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

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

Рожкова Александра Михайловна – ст. науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук, amrojkoval@yahoo.com.

### Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 05.09.2022;

одобрена после рецензирования 12.10.2022;

принята к публикации 14.10.2022.