

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.21

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА *KU70* НА ЧАСТОТУ ТРАНСФОРМАЦИИ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM***Игорь Геннадьевич Синельников¹, Валерий Юрьевич Кислицин¹, Андрей Михайлович Чулкин¹, Андрей Алексеевич Шаплин², Александра Михайловна Рожкова^{1,2}**¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук² Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова**Автор, ответственный за переписку:** Александра Михайловна Рожкова, amrojkoval@yahoo.com

Аннотация. Для увеличения частоты гомологичной рекомбинации (HR) при трансформации промышленного штамма *Penicillium verruculosum* 221-151 (ВКМ F-3972D) методом CRISPR/CAS9 был нокаутирован ген *ku70*, который кодирует белок Ku70, связывающийся в местах двуцепочечных разрывов ДНК и участвующий в процессе репарации по механизму негомологичного соединения концов. Предположительно, новый реципиентный штамм *P. verruculosum* Δ*niaD*Δ*ku70* должен иметь повышенную частоту гомологичной рекомбинации при трансформации в сравнении с реципиентным штаммом *P. verruculosum* Δ*niaD* за счет интегративной встройки экспрессионной кассеты только по механизму HR. В качестве маркерного был выбран ген *pep1*, кодирующий собственную аспартат-протеазу. Однако было показано, что нокаут гена *ku70* привел к существенному снижению частоты ко-трансформации в штамме *P. verruculosum* Δ*niaD*Δ*ku70* в сравнении с штаммом *P. verruculosum* Δ*niaD* при одинаковой нагрузке вносимой ДНК (3 мкг). При этом число копий гена *pep1* в рекомбинантных штаммах серии *P. verruculosum* *Pepl* (с нативным Ku70) составляло от 3 до 28, что свидетельствовало о преобладании механизма негомологичной рекомбинации (NHEJ).

Ключевые слова: CRISPR/CAS9, *ku70*, гомологичная рекомбинация

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-4-460-467

Список сокращений: ЦБГ1 – целлобиогидролаза I, БГЛ – β-глюкозидаза, КсилА – ксиланаза, ФП – ферментный препарат, МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза, HR – гомологичная рекомбинация, NHER – негомологичная рекомбинация.

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

Для цитирования: Синельников И.Г., Кислицин В.Ю., Чулкин А.М., Шаплин А.А., Рожкова А.М. Влияние нокаута гена *ku70* на частоту трансформации мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2023. Т. 64. № 4. С. 460–467.

ORIGINAL ARTICLE

**INFLUENCE OF KU70 GENE KNOCKOUT ON TRANSFORMATION
FREQUENCY OF PENICILLIUM VERRUCULOSUM MYCELIAL FUNGI**

Igor G. Sinelnikov¹, Valeriy Yu. Kislitsin¹, Andrey M. Chulkin¹, Andrey A. Shaplin², Aleksandra M. Rozhkova^{1,2}

¹ Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

² Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Corresponding author: Alexandra Mikhailovna Rozhkova amrojkova@yahoo.com

Annotation. To increase the frequency of homologous recombination (HR) during the transformation of the industrial strain *Penicillium verruculosum* 221-151 (VKM F-3972D), the *ku70* gene encoding the Ku70, which binds at the sites of double-stranded DNA breaks and is involved in the repair process by the non-homologous end joint (NHEJ), was knocked out by the CRISPR/CAS9 method. Presumably, the new host strain, *P. verruculosum* Δ niaD Δ ku70, should have had an increased frequency of homologous recombination during transformation in comparison with the host strain *P. verruculosum* Δ niaD due to the integrative insertion of the expression cassette only by the HR mechanism. The *pep1* gene encoding homologous aspartate protease was chosen as a marker. However, it was shown that the knockout of the *ku70* gene led to a dramatic decrease in the frequency of co-transformation in the *P. verruculosum* Δ niaD Δ ku70 strain compared to the *P. verruculosum* Δ niaD strain at the same load of exogenous DNA (3 μ g). The number of copies of the *pep1* gene in recombinant strains of the *P. verruculosum* Pep1 (with a native Ku70) series ranged from 3 to 28 copies, which indicated the predominance of the non-homologous recombination mechanism.

Keywords: CRISPR/CAS9, *ku70*, homologous recombination, non-homologous end joint

Financial Support. The work was supported by Russian Science Fund (Grant #22-24-00997).

For citation: Sinelnikov I.G., Kislitsin V.Yu., Chulkin A.M., Shaplin A.A., Rozhkova A.M. Influence of *ku70* gene knockout on transformation frequency of *Penicillium verruculosum* mycelial fungi // Vestn. Moscow. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2023. T. 64. N 4. S. 460–467.

Промышленный штамм *Penicillium verruculosum* 221-151 (VKM F-3972D) является эффективным продуцентом целлюлазных препаратов с высоким содержанием целлобиогидролаз (ЦБГ) и β -глюкозидазы [1]. Для получения препаратов рекомбинантных ферментов из штамма *P. verruculosum* 221-151 был получен реципиентный штамм *P. verruculosum* Δ niaD, а также разработана экспрессионная система на основе промоторной и терминаторной областей гена *cbh1*, кодирующего целлобиогидролазу 1 (ЦБГ1) – основной фермент целлюлолитического комплекса гриба [2].

При использовании экспрессионной и трансформационной систем гриба *P. verruculosum*

Δ niaD ранее были созданы рекомбинантные штаммы-продуценты гетерологичных β -глюкозидазы (БГЛ, КФ 3.2.1.21) *Aspergillus niger* [3] и ксиланазы А (КсилА, КФ 3.2.1.8) *Penicillium canescens* [4]. Было отмечено, что при гетерологичной экспрессии гена *xylA*, кодирующего КсилА, и гена *bgII*, кодирующего БГЛ, наблюдалось разделение полученных рекомбинантных штаммов на «моно»-продуценты, содержащие 50–80% целевого фермента, и «гетеро»-продуценты с содержанием целевого фермента около 20%. Методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) было установлено, что в геноме «моно»-продуцентных штаммов может находиться более

20 копий целевого гена, а в геноме «гетеро»-продуцентов – всего 2–6 копий. При этом во всех штаммах сохранялся ген *cbh1* [5], что вполне ожидаемо, поскольку в мицелиальных грибах преобладает механизм негомологичной рекомбинации (NHEJ), а частота встраивания ДНК в гомологичные участки геномной ДНК составляет всего 5–10% [6].

Для сдвига механизма рекомбинации в сторону HR в мицелиальных грибах часто прибегают к нокауту гена *ku70*, кодирующего белок Ku70, который связывается в местах двуцепочечных разрывов ДНК и участвует в процессе репарации по механизму NHEJ [7–10]. Применение этого подхода к штамму *P. verruculosum* расширило бы панель новых продуцентов рекомбинантных белков, только за счет замены гена *cbh1* на целевой ген по механизму HR, что привело бы к получению ферментных препаратов без ЦБГ1, востребованных, например, целлюлозно-бумажной промышленностью при отбелке бумаги.

Таким образом, цель работы состояла в определении влияния белка Ku70 на частоту трансформации штамма *P. verruculosum* 221-151. Для этого нами был осуществлен нокаут гена *ku70* с помощью адаптированной ранее системы CRISPR/Cas9 [11], а также трансформа-

ция нокаутированного штамма *P. verruculosum* Δ*niaD*Δ*ku70* и штамма *P. verruculosum* Δ*niaD* плазмидой, несущей маркерный ген *pep1*, кодирующий аспартагную протеазу.

Экспериментальная часть

Нокаут гена *ku70* в штамме *P. verruculosum* 221-151

Нокаут гена *ku70* проводили адаптированным методом CRISPR/CAS9 по ранее описанной методике [11].

Последовательность протоспейсера для нокаута гена *ku70* (5'-agacgacgaaatttccagg-3') была подобрана в программе ChopChop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>). Плазмида pGCKu (рис. 1) была получена путем лигирования по рестрикционным сайтам *Bam*HI и *Sal*I в плазмиду pGpdCas9 [11] фрагмента ДНК, кодирующего sgРНК для гена *ku70*, который был получен методом ПЦР из плазмиды p5SniaD [11] с использованием праймеров *ku70sgR+* (agacgacgaaatttccagggttttagagctagaatagcaag) и *ku70sgR-* (cctggaaatttctgctgctctattcgtccttcatacaacag).

Для одновременного нокаута генов *niaD* и *ku70* проводили трансформацию штамма *P. verruculosum* 221-151 [1] плазмидами p5SniaD и pGCKu (рис. 1), по описанной ранее методике [11].

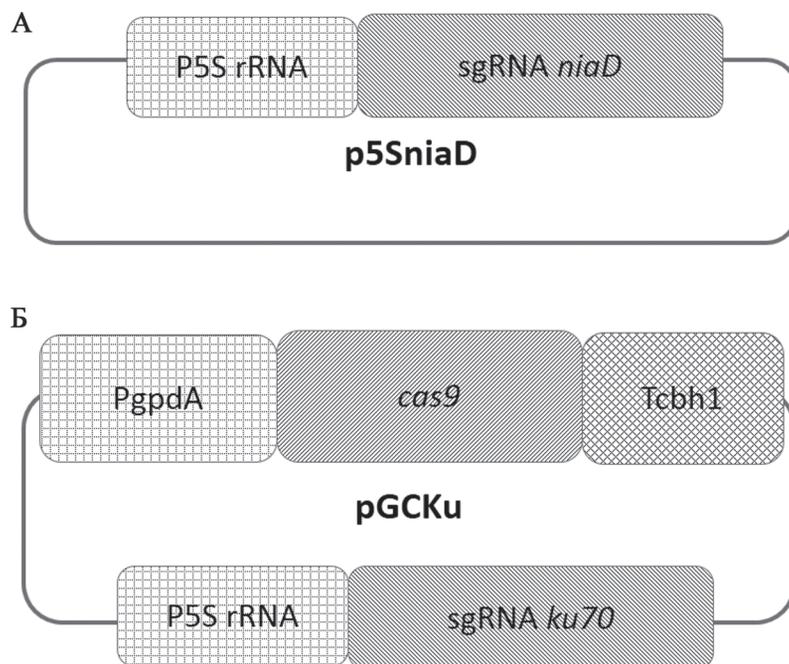


Рис. 1. Схема плазмид p5SniaD (А) и pGCKu (Б)

Ауксотрофные трансформанты отбирали на селективной среде (SM) [11] с добавлением 0,7 М NaClO₃ в качестве селективного агента и 10 мМ NH₄Cl в качестве источника азота. Колонии, выросшие на этой среде, пересевали на минимальную среду (MM) [11] с 10 мМ NH₄Cl или 10 мМ NaNO₃ в качестве источника азота. Клоны, выросшие на среде с NaNO₃, исключали из дальнейшего анализа.

Из отобранных на селективной среде клонов выделяли геномную ДНК набором DNeasy Plant Mini Kit («Qiagen», США). Выделенную ДНК использовали для амплификации фрагментов гена *ku70* с помощью олигонуклеотидов *ku70F1* (tgaggtgcgctctgc) и *ku70R2* (taggagagaccgcccg).

Аmplифицированные фрагменты ДНК анализировали методом секвенирования по Сэнгеру и методом поиска мутаций.

Получение плазмиды рUC-SBH1-Pep1

Геномную ДНК, выделенную из *P. verruculosum* 221-151, использовали в качестве матрицы для амплификации гена *pep1*, кодирующего аспартат-протеазу с использованием полимеразы Phusion («NEB», США). Для проведения ПЦР использовали термоциклер «C1000 Touch Bio-Rad» (США). Полученный ПЦР-продукт (вставка) клонировали методом независимого лигирования [12]. Вставку и линеаризованный вектор рUC-SBH1 обрабатывали T4 ДНК-полимеразой в присутствии дезоксиаденозинтрифосфата (dATP) и дезокситимидинтрифосфата (dTTP) соответственно. Лигирование вставки (150 нг) и вектора рUC-SBH1 (50 нг) проводили путем смешивания и инкубации при 37 °С; полученную смесь использовали для трансформации клеток *E. coli* XL1-blue («Agilent», США) по стандартному протоколу [13]. Выделение полученной плазмиды рUC-SBH1-Pep1 осуществляли методом щелочного лизиса с помощью набора «Plasmid Miniprep» («Евроген», Россия).

Трансформации *P. verruculosum* *AniaD* и *P. verruculosum* *AniaDku70*

Трансформацию реципиентных штаммов *P. verruculosum* *AniaD* и *P. verruculosum* *AniaDku70* осуществляли целевой плазмидой рUC-SBH1-Pep1 по адаптированной методике, описанной в [14]. Целевая плаزمида рUC-SBH1-Pep1 несла ген *pep1*, фланкированный промотором (*pCBH1*) и терминатором

(*tCBH1*) гена целлобиогидролазы I (*cbh1*). Для селекции рекомбинантов на средах, содержащих нитрат в качестве единственного источника азота, трансформация осуществлялась совместно с селективной плазмидой рSTA-10, несущей функциональный ген *niaDA* из *Aspergillus niger*.

Для трансформации использовали одинаковое число протопластов (10¹⁰ шт.) и одинаковое количество целевой плазмидной ДНК (3 мкг) с геном *pep1*. Для каждого штамма осуществляли оценку числа трансформантов методом прямого подсчета колоний, выросших на селективной среде, которая содержала нитрат натрия в качестве единственного источника азота, а также оценку эффективности трансформации путем измерения числа интегрированных генов *pep1* в геном продуцента методом ПЦР в реальном времени.

Оценка эффективности трансформации методом ПЦР в реальном времени (количественная ПЦР)

Геномную ДНК, выделенную из клонов *P. verruculosum* *Pep1* и *P. verruculosum* *Δku70-Pep1*, использовали в качестве матрицы для анализа. Количественную ПЦР для определения числа копий гена *pep1* проводили так, как описано в [5], с использованием генов актина (*actA*), тубулина (*tub2*) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*gpdA*) в качестве референса (табл. 1).

Результаты и обсуждение

Получение штамма *P. verruculosum* *AniaDku70* с нокаутом гена *ku70*

После трансформации прототрофного штамма *P. verruculosum* 221-151 плазмидами рGСКu и р5SniaD (рис. 1) на селективной среде с хлоратом натрия и хлоридом аммония было отобрано 18 трансформантов, из которых 16 были не способны утилизировать нитрат в качестве источника азота. Из 8 случайно отобранных клонов была выделена геномная ДНК, использованная для амплификации и секвенирования фрагмента гена *ku70*. В результате секвенирования было установлено, что у 4 клонов имелись мутации в месте двухцепочечного разрыва ДНК нуклеазой Cas9, приводящие к сдвигу рамки считывания (рис. 1).

Для дальнейших экспериментов был отобран клон № 5 с генотипом *Δku70AniaD*.

Олигонуклеотиды, используемые для ПЦР в реальном времени

Название олигонуклеотида	Последовательность 5-3'	Ген
PVACTQD1	ACAAGAAATCCAGACCGCTTCCC	Актин (<i>actA</i>)
PVACTQR1	TTTCGAGACCGATGACGGAAGG	
PVGPDQD2	AACGGCAAGCGCGTCAAGTTCT	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (<i>gpdA</i>)
PVGPDQR2	ACCCTTCAAGTGAGCAGAGGCCTT	
PVTUBQD1	GCTTCCGGCAACAAATATGTCCC	Тубулин (<i>tub2</i>)
PVTUBQR1	CCGGACTGACCGAAAACAAAGTTG	
Pep1A_F	TCTAGTCCCTGTCTTCGG	Аспаргатная протеаза (<i>pep1</i>)
Pep1A_R	AGAAAAGGTCATAGGTTGCC	

Получение штаммов *P. verruculosum* Δ*ku70*-*Pep1* и *P. verruculosum* *Pep1* и анализ копийности гена *pep1*

Трансформацию целевой плазмидой pUC-SBHI-*Pep1*, содержащей ген *pep1*, кодирующий собственную аспаргатную протеазу *Pep1*, проводили параллельно в штаммах *P. verruculosum* Δ*niaD* и *P. verruculosum* Δ*niaD*Δ*ku70* (клон 5).

Скрининг трансформантов на минимальной среде, содержащей нитрат натрия в качестве единственного источника азота, позволил идентифицировать 45 трансформантов, полученных на базе штамма *P. verruculosum* Δ*niaD*, тогда как в случае использования штамма *P. verruculosum* Δ*niaD*Δ*ku70* было получено лишь 12 трансформантов (рис. 3).

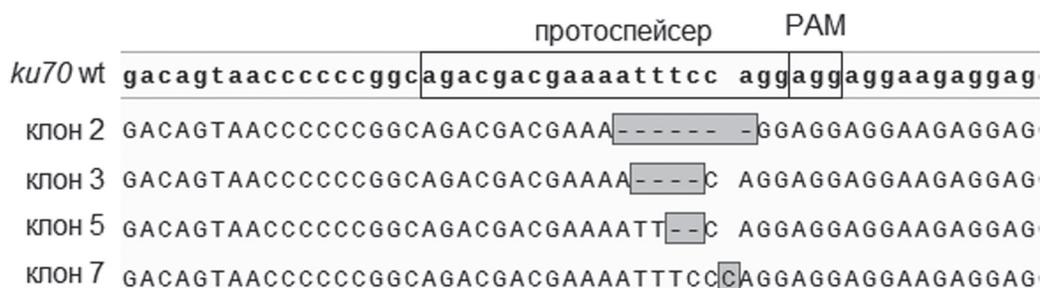


Рис. 2. Выравнивание фрагментов гена *ku70*, содержащих мутации в районе протоспейсера у клонов, отобранных после трансформации плазмидой pGC|Ku

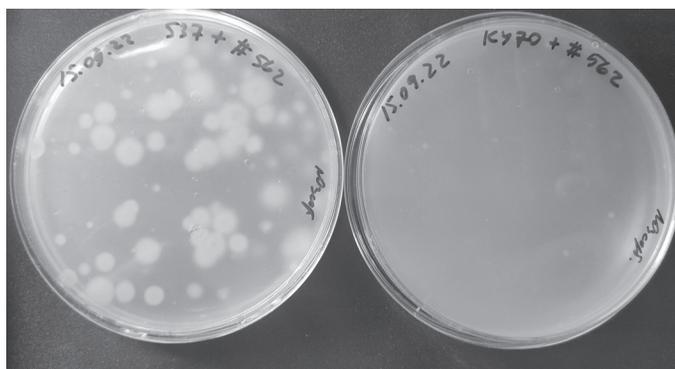


Рис. 3. Визуальная частота трансформации штаммов *P. verruculosum* Δ*niaD* (слева) и *P. verruculosum* Δ*niaD*Δ*ku70* (справа) плазмидой pUC-SBHI-*Pep1*

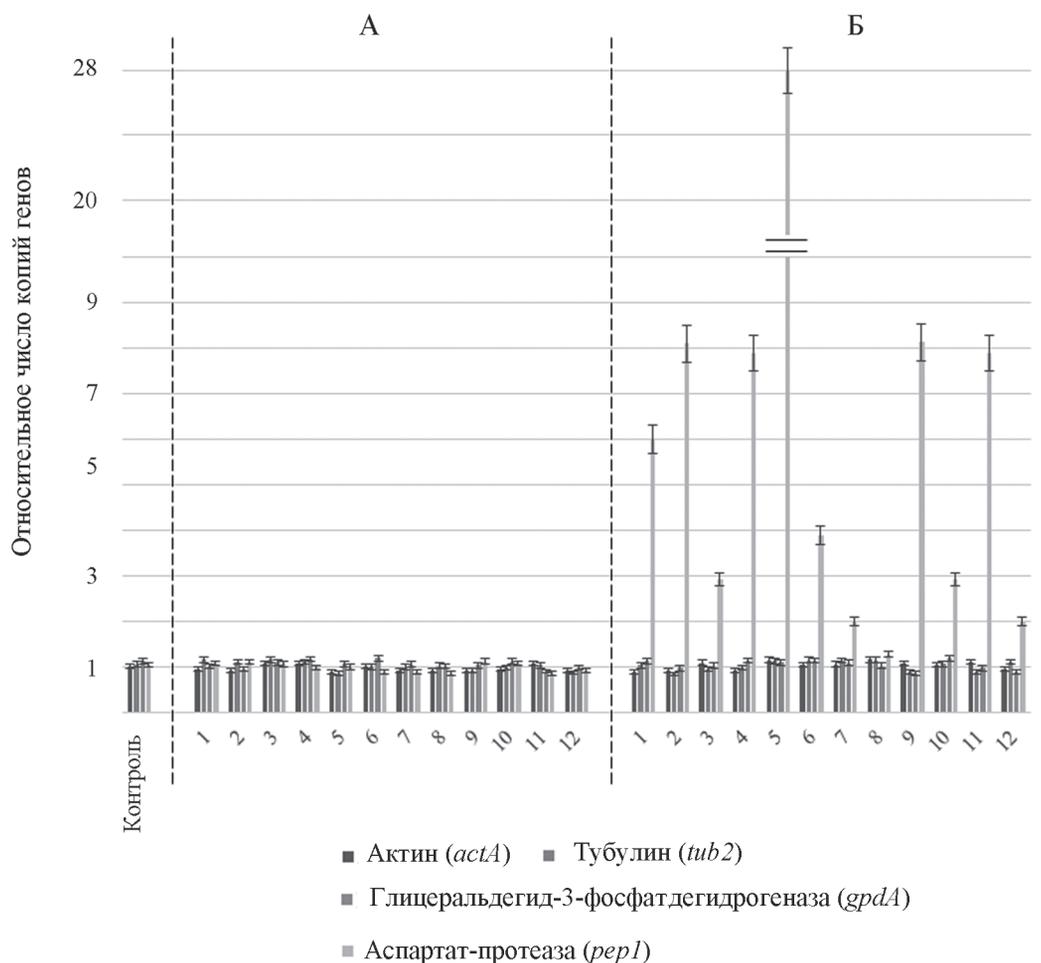


Рис. 4. Относительное число копий генов *pep1* в штаммах *P. verruculosum* Δku70-Pep1 (А) и *P. verruculosum* Pep1 (Б) в сравнении с маркерными генами: актин (*actA*), тубулин (*tub2*), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (*gpdA*), аспартат-протеаза (*pep1*)

Результаты анализа числа копий экспрессионной кассеты, содержащей ген *pep1*, в геноме 25 рекомбинантных штаммов *P. verruculosum* Pep1 показал, что интеграция в геном гена *pep1* происходит с высокой частотой и число интеграций варьирует от 2 до 28 (учитывая наличие одной копии нативного гена в геноме), более 50% трансформантов содержали более трех копий гена *pep1* (рис. 4). Амплификация локуса гена *cbh1* методом ПЦР подтверждает сохранение целостности этого участка генома и отсутствие гомологичной рекомбинации с выщеплением гена *cbh1*.

Все 12 трансформантов серии *P. verruculosum* Δku70-Pep1, полученные на основе штамма с нокаутом гена *ku70* были также проанализированы с помощью ПЦР в реальном времени (рис. 4). Ни один из полученных рекомбинантных штаммов не имел дополнительной копии гена *pep1*, что свидетельствует о том, что рекомбинация целевой плазмиды pUC-СВН1-Pep1 не произошла,

однако рост на нитрате в качестве источника азота свидетельствовал об успешной интеграции селективной плазмиды pSTA-10, содержащей ген *niaDA* из *Aspegilus niger*. Интеграция селективной плазмиды была подтверждена прямой амплификацией полноразмерного гена *niaDA* из генома штаммов реципиентов *P. verruculosum* Δku70-Pep1.

Репарация двуцепочечных разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации (HR) или негомологичного соединения концов (NHEJ) действует конкурентно [15], и преобладание NHEJ над HR рассматривается как основная причина низкой эффективности целевой трансформации генов в грибах [6]. Соответственно, одной из стратегий повышения частоты трансформации является ингибирование или устранение пути NHEJ, что заставляет трансформированную ДНК интегрироваться через путь HR. Существует ряд работ, в которых показано, что нарушение NHEJ путем удаления одного или нескольких ключе-

вых компонентов, которыми являются белки семейства Ku70/80, приводит к существенному повышению эффективности встройки по HR-механизму [16]. В частности, сообщения об успешности этих подходов были опубликованы для *Neurospora crassa* [17], нескольких видов *Aspergillus* sp. [18–20] и *Penicillium* sp. [21]. Большинство исследований, описывающих повышенную эффективность HR у мицелиальных грибов, были сосредоточены на нокауте или делеции гена *ku70*.

В настоящей работе было показано, что использование штамма реципиента с нокаутом *ku70* вызвало резкое снижение эффективности трансформации и снижение скорости роста полученных трансформантов по сравнению с исходным штаммом. Полученные результаты доказывают, что в *P. verruculosum* также преобладают механизмы негомологичной рекомбинации (NHEJ), что позволяет добиваться высокой частоты и эффективности трансформации в реципиентном штамме *P. verruculosum* Δ*niaD*. При этом отсутствие интеграции целевой плазмиды pUC-SBH1-Pep1 в штамм с нокаутом *ku70* можно объяснить тем, что pUC-SBH1-Pep1 содержит два участка гомологии в области локуса гена *cbh1*: промотор (*pCBH1*) и терминатор (*tCBH1*) размерами 1392 и 560 п.о. соответственно, что может являться недостаточным для эффективной гомологичной рекомбинации. Как показано в работе [22] на примере *Aspergillus chevalieri*, эффективность замены гена в штаммах с делецией *ku70* напрямую зависела от длины используемых фланкирующих участков и была наиболее эффективна при длинах промоторной и терминаторной областей более 1000 п.о. Можно сделать два предположения для объяс-

нения интеграции вспомогательной плазмиды pSTA-10, содержащей ген *niaDA*.

Во-первых, при создании штамма реципиента *P. verruculosum* Δ*niaD*Δ*ku70* в геном происходит встройка плазмиды, содержащей нуклеазу Cas9, которая имеет участок гомологии в 2400 п.о. (*ori* и *AmpR*) из pSTA-10, благодаря чему запускается процесс HR. Однако этот участок гомологии сохранился и в целевой плазмиде pUC-SBH1-Pep1, при этом ее интеграцию совместно с селективной плазмидой не удалось зафиксировать, что может свидетельствовать о других механизмах интеграции. Вероятно, в дальнейших исследованиях следует использовать автономно-реплицирующийся плазмиды на основе AMA1 для делеции целевых генов во избежание встройки частей вектора в геном штамма.

Во-вторых, существует *ku*-независимый механизм NHEJ, который гораздо менее эффективен, вследствие чего мы и наблюдаем встраивание исключительно селективной плазмиды pSTA-10 и крайне низкую частоту трансформации. Такой механизм *ku*-независимой рекомбинации был описан для *Neurospora crassa* и *Magnaporthe grisea* [23–25].

Таким образом, в результате нокаута гена *ku70* было доказано, что механизм интеграции экзогенной ДНК в геном гриба *P. verruculosum* происходит по механизму NHEJ, как и у большинства мицелиальных грибов. Эта информация необходима для понимания молекулярно-генетических механизмов получения новых штаммов *P. verruculosum* для промышленной биотехнологии. Стало очевидным, что для смены механизма интеграции с NHEJ на HR необходимо удлинить фланкирующие области регуляторных областей гена *cbh1*, что мы и предполагаем осуществить в нашей дальнейшей работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M. et al. // *Biotechnol. J.* 2010. Vol. 5. P. 871 (DOI: 10.1002/biot.201000050)
- Синицын А.П., Рожкова А.М., Синицына О.А. и др. 2010. Пат. № 2378372 РФ.
- Dotsenko G.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., et al. // *Process Biochemistry.* 2015. Vol. 50. 1258 (DOI: 10.1016/j.procbio.2015.05.008).
- Осипов Д.О., Рожкова А.М., Матыс В.Ю. и др. // *Катализ в промышленности.* 2010. № 5. С. 63.
- Чулкин А.М., Кислицин В.Ю., Зоров И.Н., Синицын А.П., Рожкова А.М. // *Биотехнология.* 2019. Т. 35. № 5. С. 51 (DOI:10.21519/0234-2758-2019-35-5-51-57).
- Kück U., Hoff B. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Vol. 86. N 1. P. 51.
- Pöggeler S., Kück U. // *Gene.* 2006. Vol. 378. P. 1.
- Choquer M., Robin G., Le Pecheur P., Giraud C., et al. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2008. Vol. 289. P. 225.
- Koh C. M. J., Liu Y., Moehninsi, Du M., Ji L. // *BMC Microbiology.* 2014. Vol. 14. P. 50.
- Gandia M., Xu S., Font C., Marcos J. F. // *Fungal biology.* 2016. Vol. 120. P. 317.
- Kislitsin V.Y., Chulkin A.M., Zorov I.N. // *Biores. Technol. Rep.* 2022. Vol. 18. P. 1 (DOI 10.1016/j.biteb.2022.101023)
- Thieme F, Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. // *PLoS*

- One. 2011. Vol. 6. N 6. P. e20556. (DOI: 10.1371/journal.pone.0020556)
13. Froger A., Hall J.E. // *J Vis Exp*. 2007. Vol. 6. P. 253. (DOI: 10.3791/253).
14. Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V., Clutterbuck A.J. // *Curr Genet*. 1995. Vol. 28. N 5. P. 474 (DOI: 10.1007/BF00310818).
15. Krappmann S. // *Fungal Biology Reviews*, 2007. Vol. 21. N 1. P. 25 (doi.org/10.1016/j.fbr.2007.02.004).
17. Honda Y., Kobayashi K., Kirimura K. // *Biosci Biotechnol Biochem*. 2011. Vol. 75. N 8. P. 1594 (DOI: 10.1271/bbb.110015).
18. Ninomiya Y, Suzuki K, Ishii C, Inoue H. // *Proc Natl Acad Sci*. 2004. Vol. 101. N 33. P. 12248 (DOI: 10.1073/pnas.0402780101).
19. Carvalho N.D., Arentshorst M., Jin Kwon M., Meyer V., Ram A.F. // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010. Vol. 87. N 4. P. 1463 (DOI: 10.1007/s00253-010-2588-1).
20. Nayak T., Szewczyk E., Oakley C.E., et al. // *Genetics*. 2006. Vol. 172. N 3. P. 1557 (DOI: 10.1534/genetics.105.052563).
21. Jin F.J, Hu S., Wang B.T., Jin L. // *Front Microbiol*. 2021. Vol. 12. P. 644404 (DOI: 10.3389/fmicb.2021.644404).
22. de Boer P, Bastiaans J, Touw H, Kerkman R, Bronkhof J, van den Berg M, Offringa R. // *Fungal Genet. Biol*. 2010. Vol. 47. N 10. P. 839 (DOI: 10.1016/j.fgb.2010.07.008).
23. Qingqing H., Yang C., Zuoyi L., Yumei T., Yongxiang L. // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2016. Vol. P. 1 (OI: 10.1080/13102818.2016.1251828).
24. Ishibashi K., Suzuki K., Ando Y., et al. // *Proc Natl Acad Sci*. 2006. Vol. 103. N 40. P. 14871.
25. Kito H., Fujikawa T., Moriwaki A., et al. // *Fungal Genet Biol*. 2008. Vol. 45. N 12. P. 1543.

Информация об авторах

Синельников Игорь Геннадьевич – мл. науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», канд. хим. наук (sinelnikov.i@list.ru);

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

Чулкин Андрей Михайлович – науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», канд. биол. наук (zcbm1@yandex.ru);

Шаплин Андрей Алексеевич – студент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (exe.andrey0081@mail.ru).

Рожкова Александра Михайловна – ст. науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», ст. науч. сотр. лаборатории физико-химии ферментативной трансформации полимеров химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (amrojko@yahoо.com).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 05.01.2023;
одобрена после рецензирования 12.02.2023;
принята к публикации 25.02.2023.