Гомологичная экспрессия ксиланазы D мицелиального гриба PENICILLIUM CANESCENS и характеристика полученного ферментного препарата

Чулкин А. М., Вавилова Е. А., Федорова Т. В., Королева О.В., Беневоленский С.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Эндоксиланазы являются ферментами, расщепляющими ксилан - основной компонент гемицеллюлоз. В этой связи эндоксиланазы представляют большой интерес как в промышленности, так и прикладной биотехнологии. Для мицелиального гриба Penicillium canescens (далее P. canescens) известна эндо-1,4-β-D-ксиланаза (XylA). Однако до настоящего времени не было известно о других эндо-1-4-β-D-ксиланазах, xylB, xylC, xylD, xylE, 10-го и 11-го семейств гликозил-гидролаз мицелиального гриба P. canescens.

Целью настоящей работы являлось создание штамма мицелиального гриба P. canescens - продуцента новой секретируемой эндо-1-4-β-D-ксиланазы xylD путем гомологичной экспрессии. Новая эндо1-4-β-D-ксиланаза получена путем клонирования и секвенирования мицелиального гриба P. canescens, конструирования рекомбинантной плазмиды pPCGXD, несущей ген xylD под контролем промотора гена β-галактозидазы. Для трансформации протопластов мицелиального гриба P. canescens PCE-7 (niaD-, xylA-) использовали плазмиды pPCGXD и pSTA-10, содержащей в качестве селективного маркера ген нитратредуктазы Aspergillus niger. Для отбора штаммов с повышенной активностью эндо-1-4-β-D-ксиланазы проводили глубинное культивирование и тестирование культуральных жидкостей на наличие соответствующей ферментативной активности. Активность эндо-1-4-β-D-ксиланазы в культуральной жидкости определяли по количеству восстанавливающих сахаров, выделяемых при гидролизе березового ксилана. Инкубацию субстрата и фермента проводили при 50C в течение 10 мин. При определении температурного оптимума инкубацию проводили в течение того же времени, но при разных температурах. При определении pH-оптимума дополнительно использовали 0.1 М ацетатные буферные растворы с различными значениями pH (от 3.0 до 7.0). За единицу активности принимали количество фермента, высвобождающее 1 мкмоль/мин восстанавливающих сахаров при указанных выше условиях. Восстанавливающие сахара определяли методом Шомоди-Нельсона. Для проверки эффективности полученного препарата фермента проводили обработку сульфатной лиственной целлюлозы после стадии КЩО (кислородно-щелочной обработки) предприятия Mondi Business Paper (Сыктывкарский ЛПК). В качестве сравнения использовали ферментный препарат Biobrite UHB (Канада). Условия обработки целлюлозы ферментным препаратом: pH (начальное значение) – 6-7, температура – 55-60оС, концентрация массы – 3,5% , время обработки - 60 минут.

Активность полученного ферментного препарата xylD составляла 190 ед./мл. Температурный и pH оптимумы ферментного препарата xylD составляли 500С и 4.5 соответственно. При обработке сульфатной лиственной целлюлозы Mondi Business Paper Сыктывкарский ЛПК после стадии КЩО ферментным препаратом xylD и последующей отмывки число Каппа достигала значения 8,2 в то время как при использовании Biobrite UHB (Канада) – 8,4. Таким образом, ферментный препарат эндо-1-4-β-D-ксиланазы xylD, продуцируемый новым рекомбинантным штаммом P. canescens сравним по физико-химическим характеристикам и эффективности отбелки лиственной целлюлозы коммерчески доступными ксиланазами.

Работа выполнена в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы» Министерства образования и науки Российской Федерации (Государственный контракт № 16.512.11.2150).