

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-ксилианоза (*XylA*). Однако до настоящего времени не было известно о других эндо-1,4-β-D-ксилианозах, *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-ксилианазы *xylD* путем гомологичной экспрессии. Новая эндо-1,4-β-D-ксилианоза получена путем клонирования и секвенирования мицелиального гриба *P. canescens*, конструирования рекомбинантной плазмиды *pCGXD*, несущей ген *xylD* под контролем промотора гена β-галактозидазы. Для трансформации протопластов мицелиального гриба *P. canescens* *PCE-7* (*niaD-*, *xylA-*) использовали плазмиды *pCGXD* и *pSTA-10*, содержащей в качестве селективного маркера ген нитратредуктазы *Aspergillus niger*. Для отбора штаммов с повышенной активностью эндо-1,4-β-D-ксилианазы проводили глубинное культивирование и тестирование культуральных жидкостей на наличие соответствующей ферментативной активности. Активность эндо-1,4-β-D-ксилианазы в культуральной жидкости определяли по количеству восстанавливающих сахаров, выделяемых при гидролизе березового ксилана. Инкубацию субстрата и фермента проводили при 50±0,5°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 *Viobrite UNB* (Канада). Условия обработки целлюлозы ферментным препаратом: pH (начальное значение) – 6-7, температура – 55-60°C, 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 50°C 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 *Viobrite UNB* (Канада) – 8,4. Таким образом, ферментный препарат эндо-1,4-β-D-ксилианазы *xylD*, продуцируемый новым рекомбинантным штаммом *P. canescens* сравним по физико-химическим характеристикам и эффективности отбелки лиственной целлюлозы коммерчески доступными ксиланозами.

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).