

Получение высокоэффективного продуцента рекомбинантного сволленина

Волков П.В., Осипов Д.О., Волчок А.А., Рожкова А.М., Сеницын А.П.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им.А.Н. Баха РАН, Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

В настоящее время существует широкий спектр ферментных препаратов, применение которых связано с процессом ферментативной деструкции природных полисахаридов в простые сахара, являющихся в свою очередь востребованным субстратом в производстве биоэтанола, биобутанола и других продуктов микробиологического синтеза.

Рекомбинантный штамм мицелиального гриба *Trichoderma reesei* – распространённый биологический объект, на основе которого получают большинство коммерческих целлюлазных ферментных препаратов, субстратная специфичность которых позволяет эффективно деградировать целлюлозосодержащие субстраты. Более того, в ферментном комплексе, секретиром грибом *Trichoderma reesei*, существуют белки, не относящиеся к классу гидролаз, функция которых до сих пор неясна. В 1992 г. группой исследователей [1] был обнаружен белок сволленин, не обладающий каталитической активностью по отношению к стандартным субстратам гидролаз, но обладающий целлюлозосвязывающим доменом (ЦСД), который, по-видимому, необходим для адсорбции сволленина на целлюлозе. Однако уровень экспрессии гомологичного сволленина незначителен (менее 1 %), что не позволяет выделить белок в индивидуальном виде и изучить его свойства подробнее. В ряде работ [2,3] были осуществлены попытки провести гетерологичную экспрессию сволленина из разных грибных источников, например *Aspergillus*, *Trichoderma*, однако, уровень синтеза рекомбинантного сволленина во внеклеточное пространство не превышал 50 мг на 1 л культуральной жидкости.

В лаборатории биотехнологии ферментов ИНБИ РАН, используя геномную ДНК грибного штамма *Trichoderma reesei*, была амплифицирована полинуклеотидная последовательность, соответствующая гену сволленина (*swol1*). Полученный ген был клонирован в экспрессионный вектор, содержащий сильный индуцибельный промотор гомологичного гена ксиланазы (*xyIA*) и терминаторную область гена эндоглюканазы (*egIII*). Реципиентный штамм *Penicillium canescens* был трансформирован полученной плазмидой с геном сволленина совместно с контрансформирующей плазмидой *pSTA10*, содержащей ген нитратредуктазы, для селекции получаемых трансформантов на средах с нитратом натрия. В результате скрининга полученных трансформантов было идентифицировано два суперпродуцента гетерологичного сволленина. Методом ПААГ-электрофореза образцов культуральной жидкости рекомбинантных штаммов был обнаружен гетерологичный белок в районе 80 кДа, что соответствовало целевому сволленину. Экспресс-методами хроматографического фракционирования ферментных препаратов, разработанными ранее в лаборатории [4], был определён состав ферментного препарата, а также выход сволленина. В результате было установлено, что выход целевого сволленина в белковом комплексе полученных трансформантов составил 13% от общего пула секреторного белка, что в 20 и более раз выше, чем в аналогичных работах, проведенных ранее. Ферментный препарат сволленина, полученный лиофильным высушиванием культуральной жидкости продуцента, показал следующий набор ферментативных активностей в ед/мг белка: ксиланаза – 38,6, α-глюканаза – 0,41, β-глюкозидаза – 0,1, авицелаза – 0,18. Таким образом, полученный ферментный препарат с содержанием сволленина на уровне 13% позволит препаративно наработать достаточное количество целевого белка в индивидуальном виде для детального изучения роли и механизма действия сволленина, а также провести ряд экспериментов по осахариванию различных видов природного сырья с добавлением нового ферментного препарата сволленина для более эффективной биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов. Работа выполнена при поддержке РФФИ в рамках конкурса «Мой первый грант» № 12-04-31002.

Список использованной литературы:

1. Saloheimo, M., et al. (2002). Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal of Biochemistry*, 269(17), 4202–4211
2. Chen, X.-ai, Ishida, N., Todaka, N., Nakamura, R., Maruyama, J.-ichi, Takahashi, H., et al. (2010). Promotion of Efficient Saccharification of Crystalline Cellulose by *Aspergillus fumigatus* Swol1. *AEM*, 76(8), 2556-2561
3. Jager G., Girfoglio M., Dollo F., Rihaldi R., Bongard H., Commandeur U., Fischer R., Spiess A., Buchs J. (2011). How recombinant swollenin from *Kluyveromyces lactis* affects cellulosic substrates and accelerates their hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels*, 4:33
4. Волков П.В., Сеницын А.П., Фёдорова Е.А., Рожкова А.М., Сатрутдинов А.Д., Зоров И.Н., Окунев О.Н.