Получение высокоэффективного продуцента рекомбинантного сволленина

Волков П.В., Осипов Д.О., Волчок А.А., Рожкова А.М., Синицын 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 reesie – 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, секретируемом грибом Trichoderma reesie, 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 reesie, была амплифицирована полинуклеотидная последовательность, соответствующая гену сволленина (swo1). Полученный ген был клонирован в экспрессионный вектор, содержащий сильный индуцибельный промотор гомологичного гена ксиланазы (xylA) и терминаторную область гена эндоглюканазы (eglIII). 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, β-глюканаза – 0,41, бета-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 Swo1, 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., Синицына О.А., Фёдорова Е.А., Рожкова А.М., Сатрутдинов А.Д., Зоров И.Н., Окунев О.Н