

Московский Государственный Университет имени. М.В. Ломоносова
Биологический факультет
Кафедра микологии и альгологии



Получение эндоглюканазы II *Penicillium verruculosum* с присоединенным целлюлозосвязывающим доменом и изучение свойств химерного белка

Выполнил:

Бибиков Никита Михайлович

Научные руководители:

ст. н. с., к.х.н. Рожкова Александра Михайловна

д.б.н., профессор Сидорова Ирина Ивановна

Переработка растительной биомассы



Зерно



Отруби



Солома



Древесина



Травы

Предобработка

Биоконверсия

C_5, C_6 - сахара

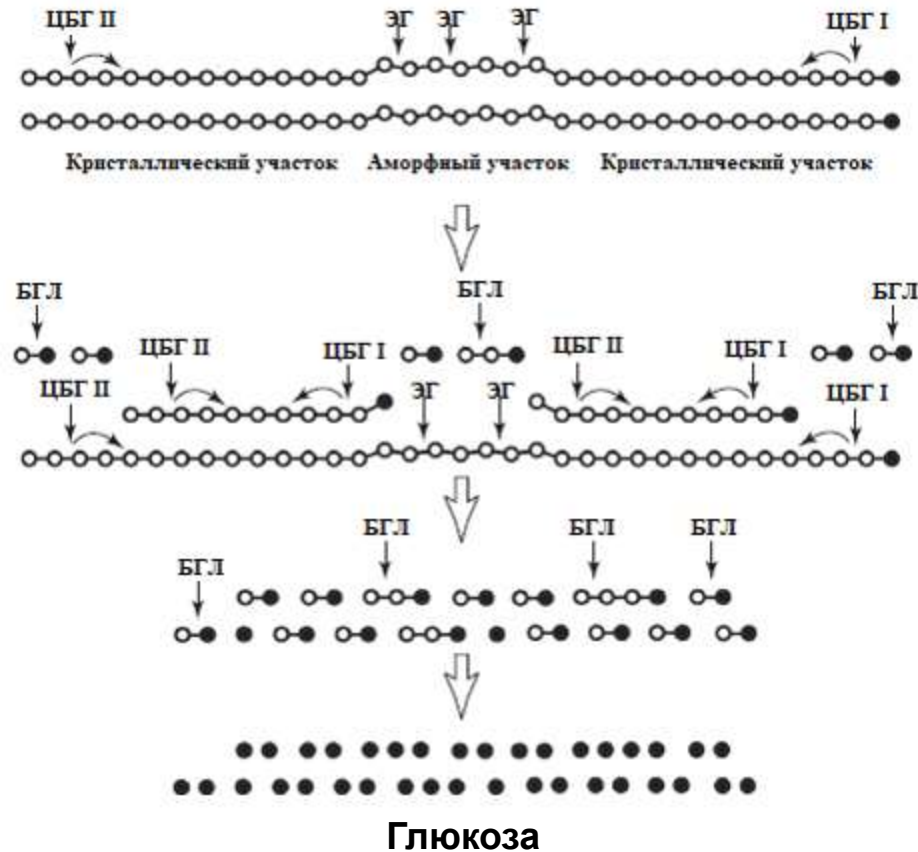
Целлюлоза – основной компонент растительного сырья, ее содержание в клеточных стенках растений достигает 65%

Комплекс карбогидраз



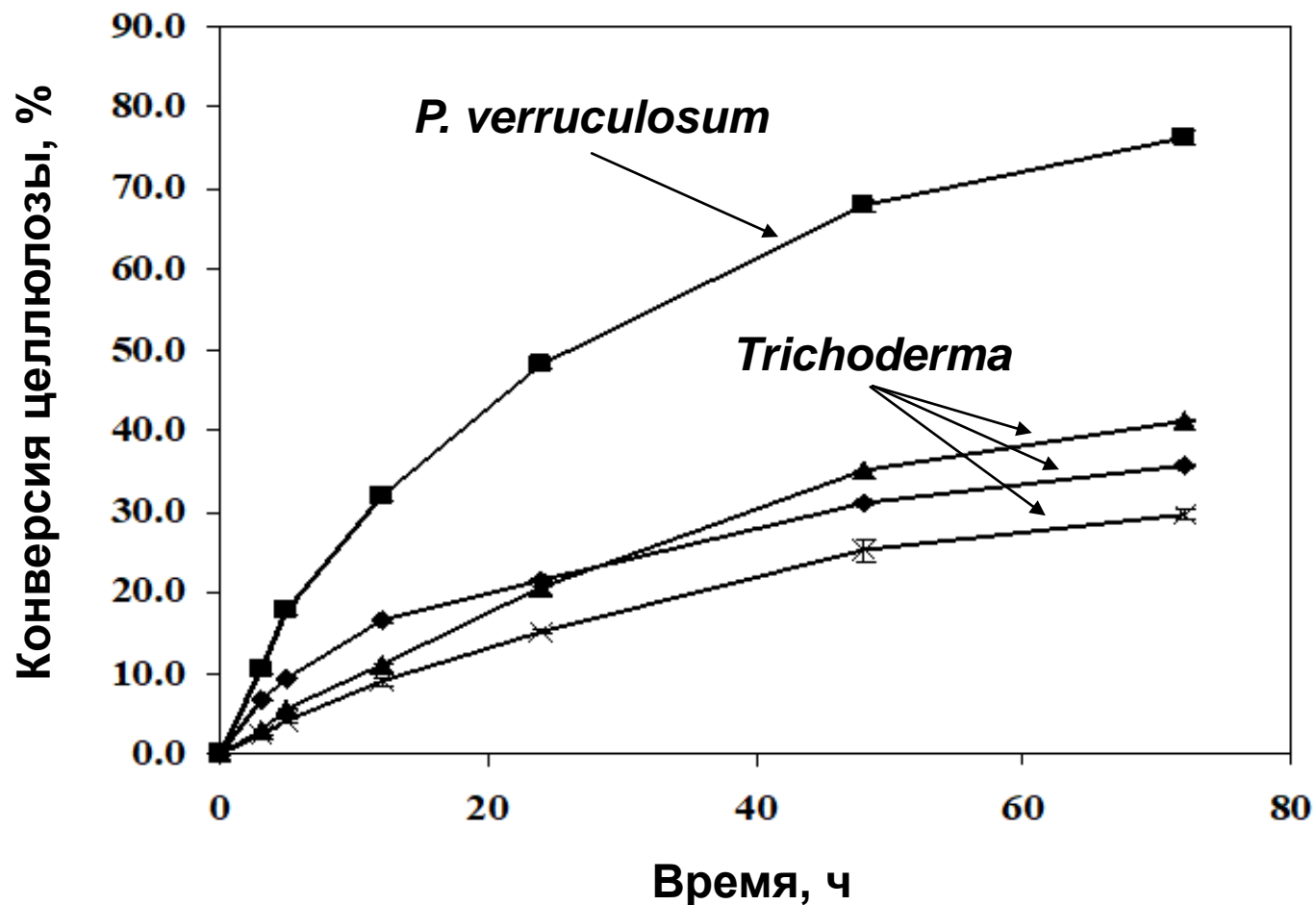
Жидкое биотопливо

Гидролитическое расщепление целлюлозы



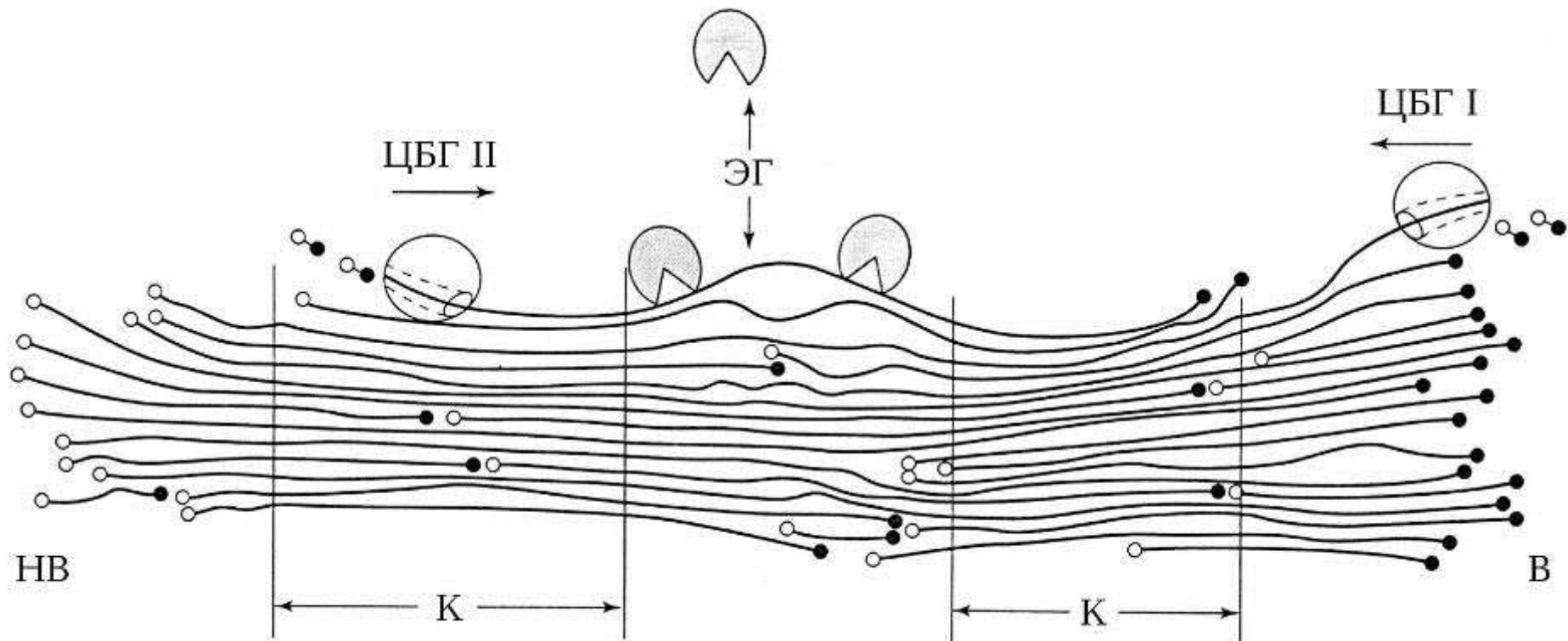
- Эндоглюканазы – расщепление аморфных участков с образованием олигосахаридов
- Целлобиогидролазы – расщепление кристаллических участков с образованием целлобиозы
- Бета-глюкозидазы – расщепление целлобиозы с образованием глюкозы

Штамм *Penicillium verruculosum* – продуцент комплекса гидролитических ферментов



Эндоглюканаза II *P. verruculosum*

- Осуществляет статистическое расщепление аморфизированных участков целлюлозы по 1,4- β -связям
- Состоит из одного каталитического домена



Целлюлозосвязывающий домен (ЦСД)

- Связывание с волокнами целлюлозы
- Повышение сродства фермента к субстрату

Целлобиогидролаза I

Каталитический домен



Активный центр

Линкер



ЦСД



Цель работы:

Создание химерной конструкции: эндоглюканазы II, содержащей ЦСД, и изучение свойств нового химерного белка

Задачи:

- Синтезировать ген *egIII-cbhl^{cbd}*, кодирующий белок ЭГ II – ЦСД и трансформировать ген в штамм-реципиент *Penicillium canescens*;
- Получить ферментный препарат, содержащий белок ЭГ II – ЦСД;
- Анализировать компонентный состав ферментного препарата, содержащего белок ЭГ II – ЦСД;
- Выделить гомогенный белок ЭГ II – ЦСД и изучить его химические свойства: ферментативную активность по субстратам, содержащим растворимые и нерастворимые формы целлюлозы, кинетические параметры гидролиза, параметры ингибирования и степень адсорбции на нерастворимом субстрате;
- Изучить гидролитическую способность фермента ЭГ II – ЦСД в синергизме с целлобиогидролазой и β -глюкозидазой *P. verruculosum*.

Штаммы грибов, использованные в работе

Penicillium verruculosum 221-151

- Целлюлолитик
- Ферменты – целлюлазы
- Продукция белка 50 – 60 г/л
- Донор генетического материала

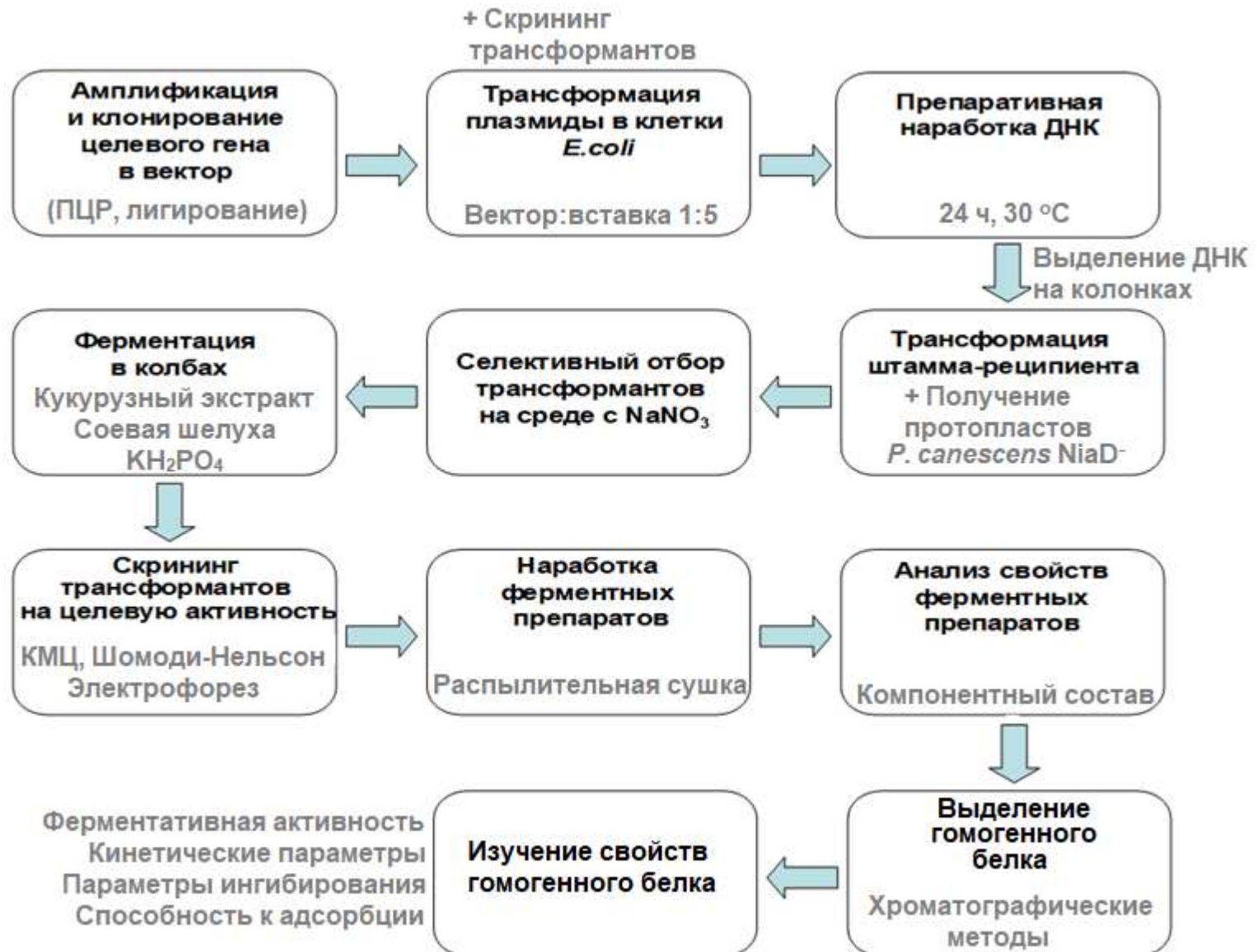


Penicillium canescens F178

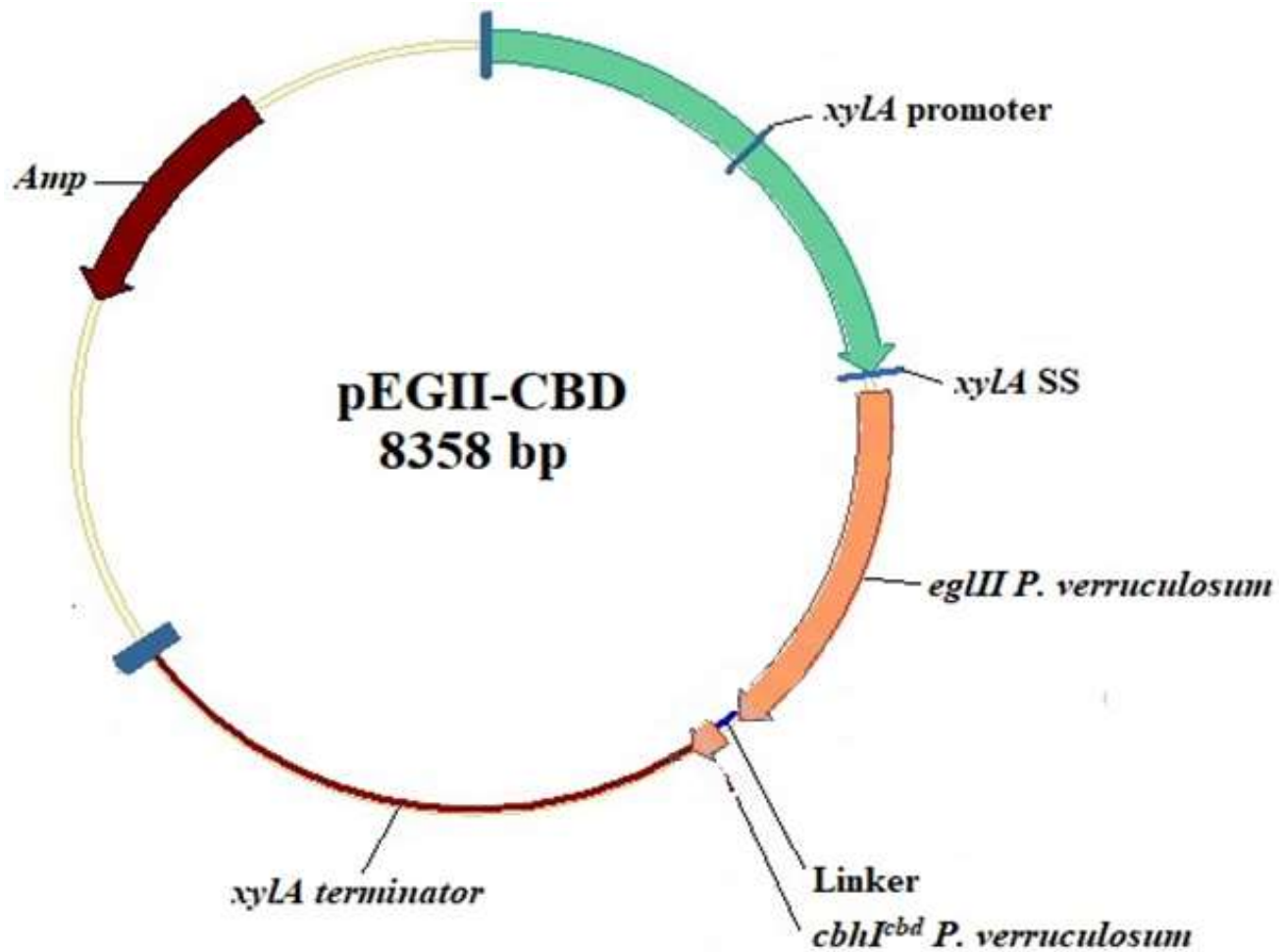
- Ксиланолитик
- Ферменты: ксиланазы, арабиназы, β -галактозидазы
- Продукция белка 7 – 12 г/л
- Реципиент генетического материала



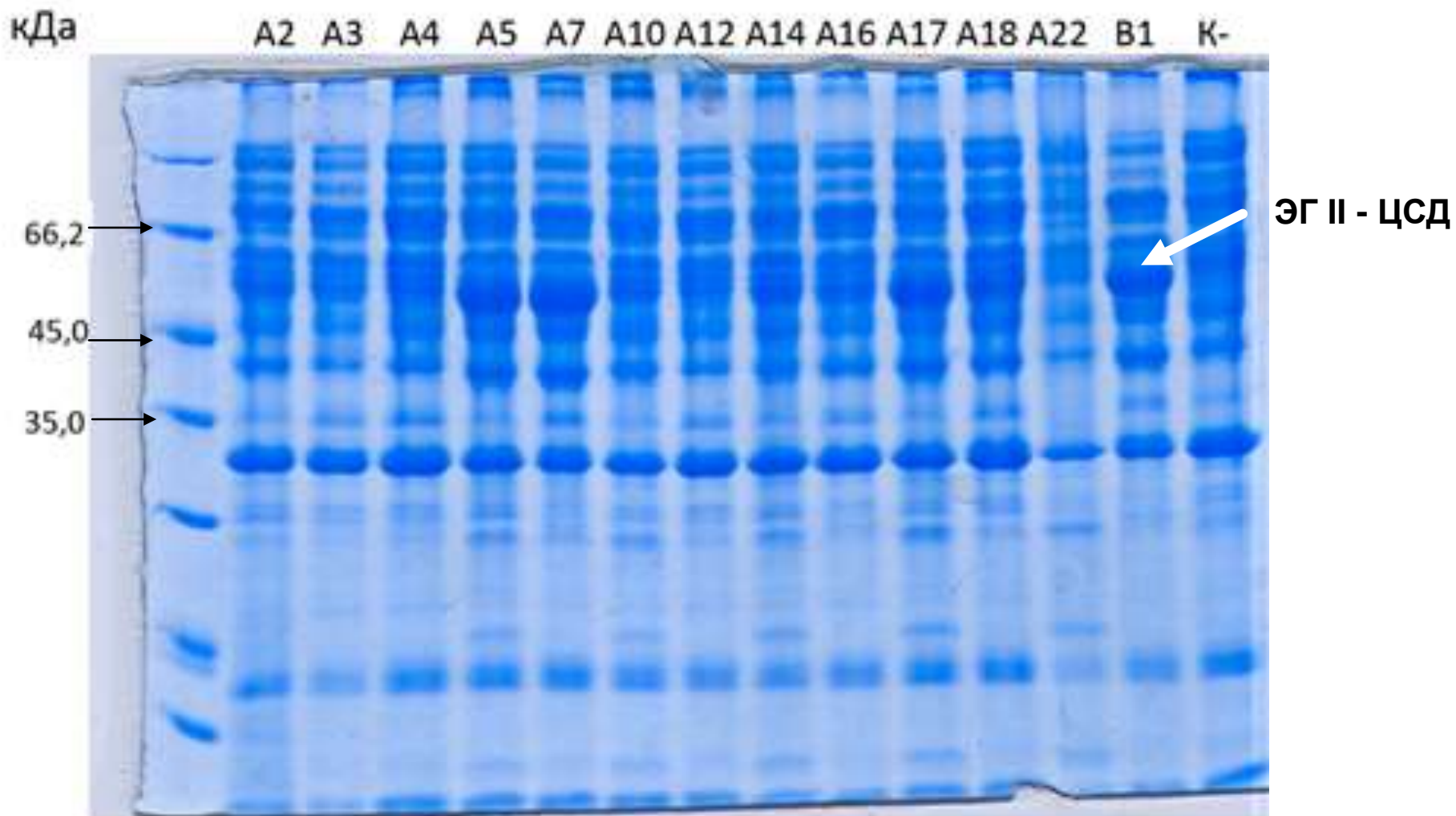
Схема эксперимента



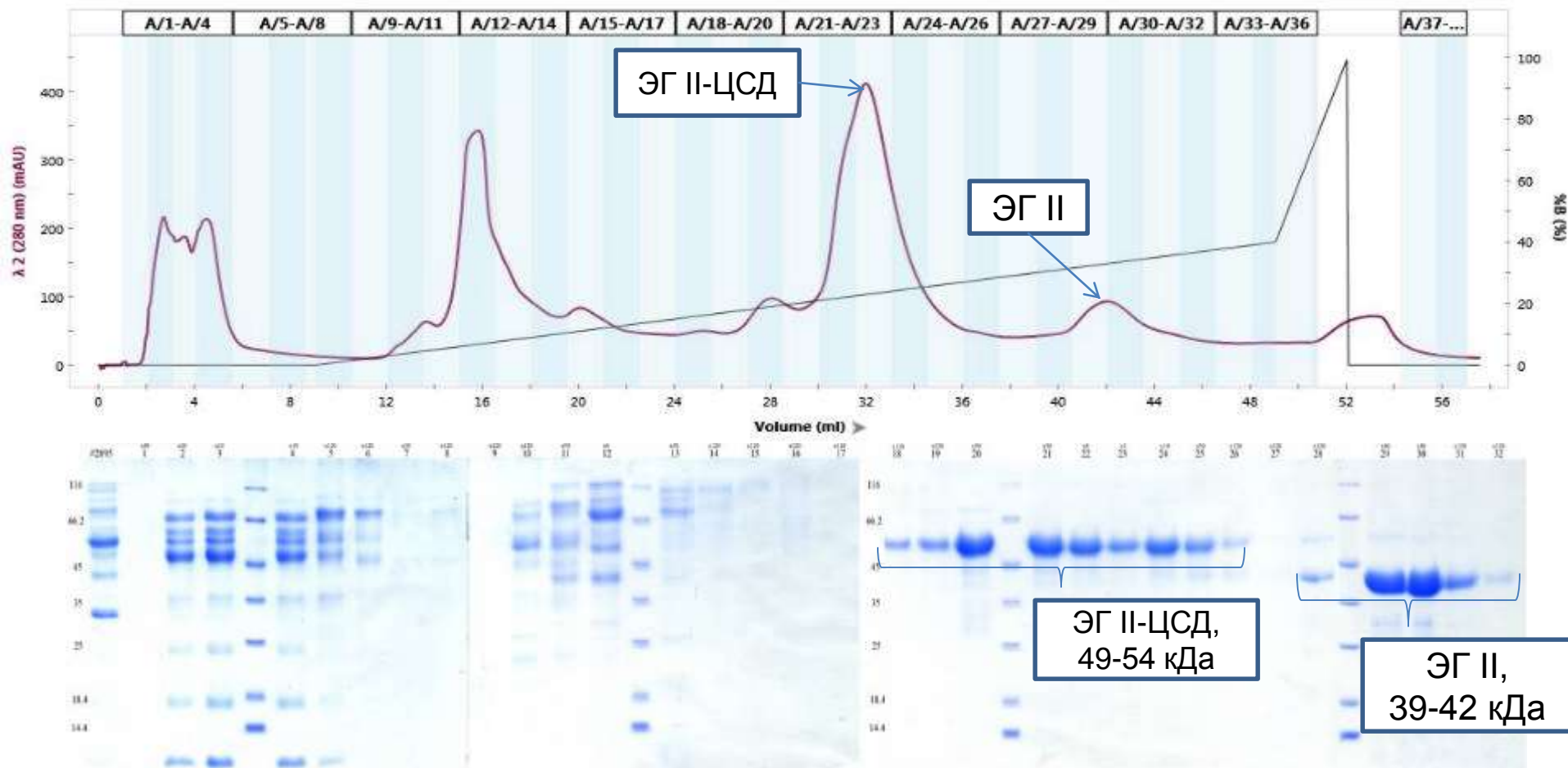
Строение плазмиды pEGII-CBD



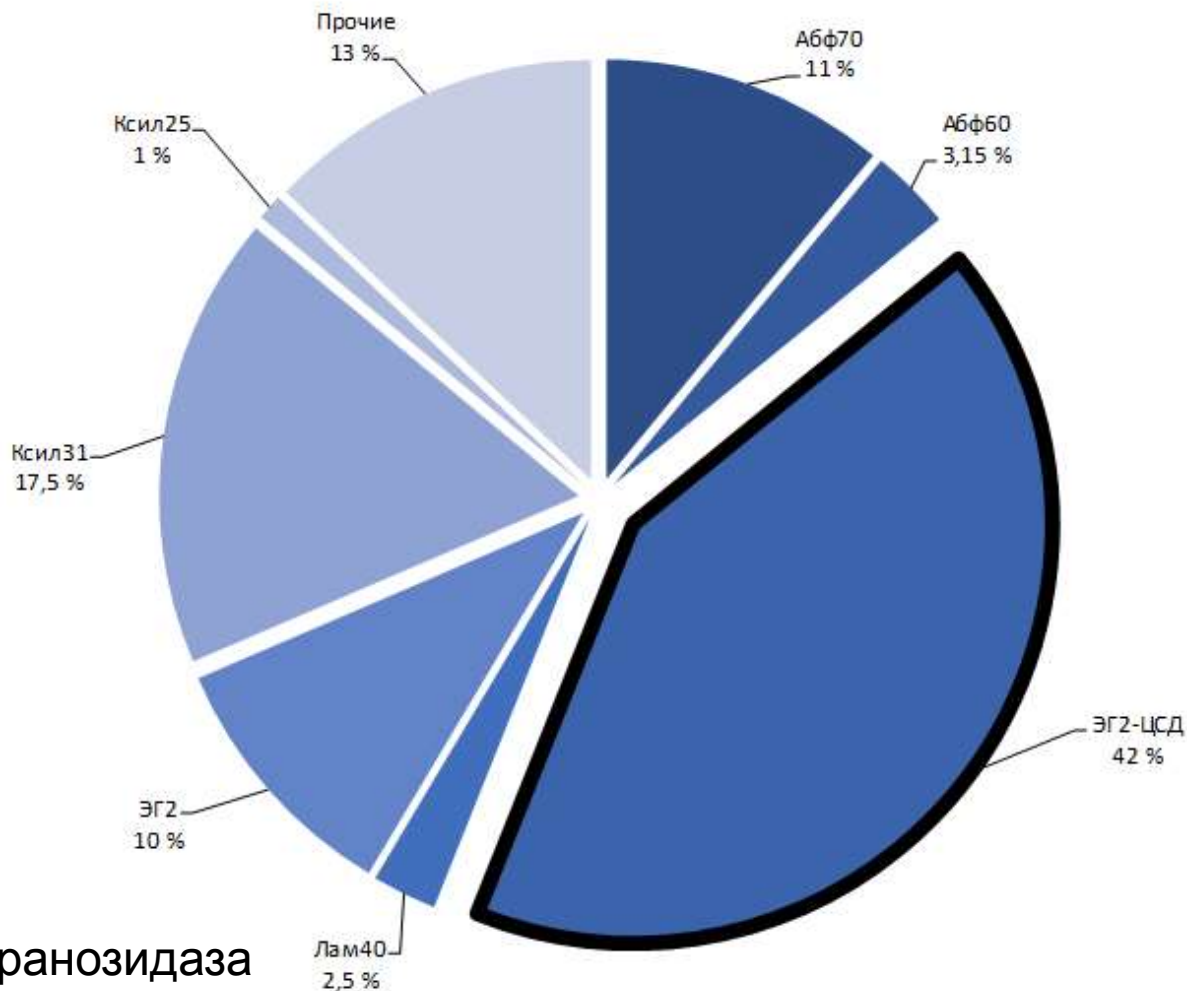
Результаты ПААГ-электрофореза образцов культуральной жидкости клонов, содержащих ЭГ II – ЦСД



Результаты анионообменной хроматографии ферментного препарата клона А5



Компонентный состав ферментного препарата клона А5



Абф – Арабинофуранозидаза

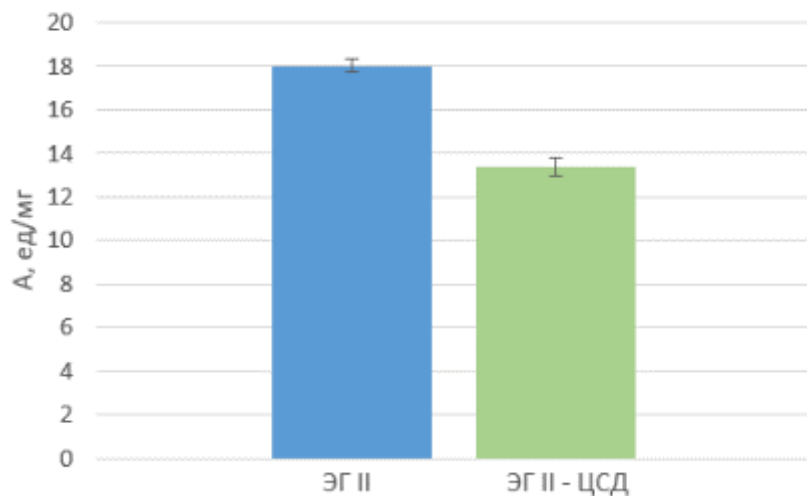
ЭГ2 – Эндоглюканаза II

Лам – Ламиarinaза

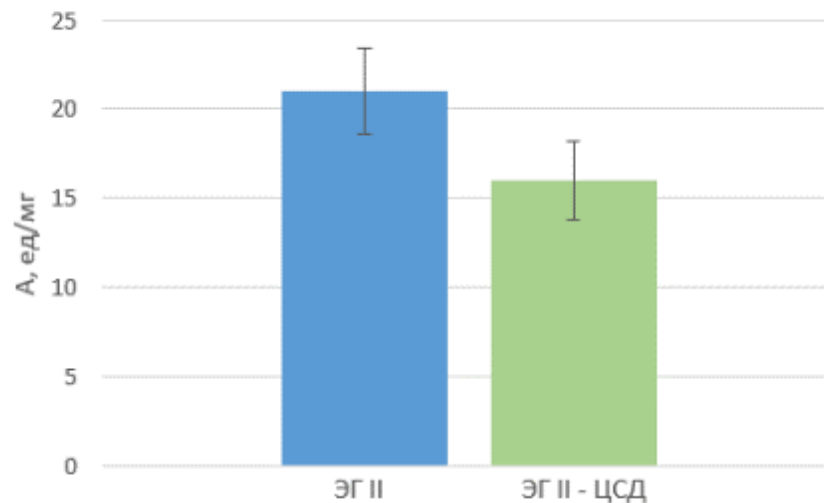
Ксил - Ксиланаза

Ферментативная активность ЭГ II – ЦСД

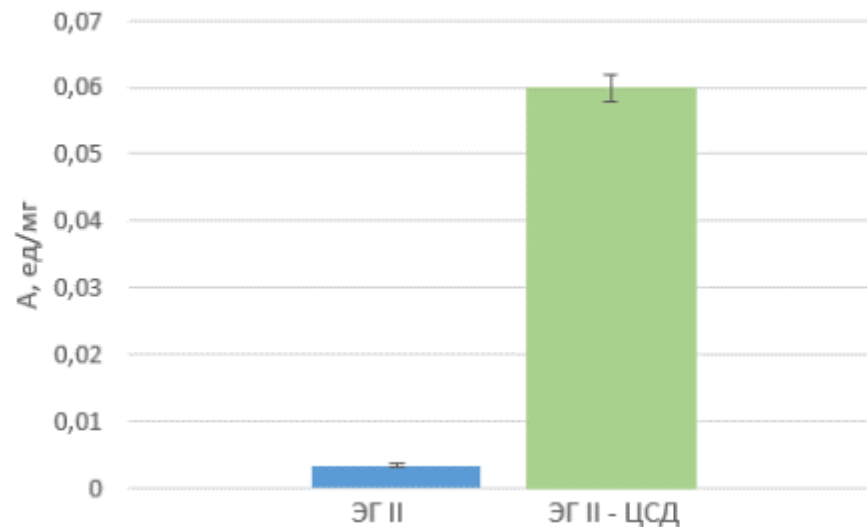
КМЦ



β -глюкан



МКЦ



Кинетические параметры ЭГ II – ЦСД

Субстрат – КМЦ

	ЭГ II	ЭГ II - ЦСД
K_M , г/л	$11,0 \pm 1,0$	$8,8 \pm 0,5$
$K_{кат}$, с ⁻¹	$51,6 \pm 3,7$	$11,1 \pm 0,5$
$K_{кат}/K_M$, г/л*с	$4,9 \pm 0,1$	$1,23 \pm 0,01$

Параметры ингибирования
ЭГ II - ЦСД целлобиозой
Субстрат – КМЦ

	ЭГ II	ЭГ II - ЦСД
K_i мМ	$0,02 \pm 0,01$	$0,013 \pm 0,008$
Тип ингибирования	Конкурентный	

Адсорбция ферментов на нерастворимом субстрате (МКЦ)

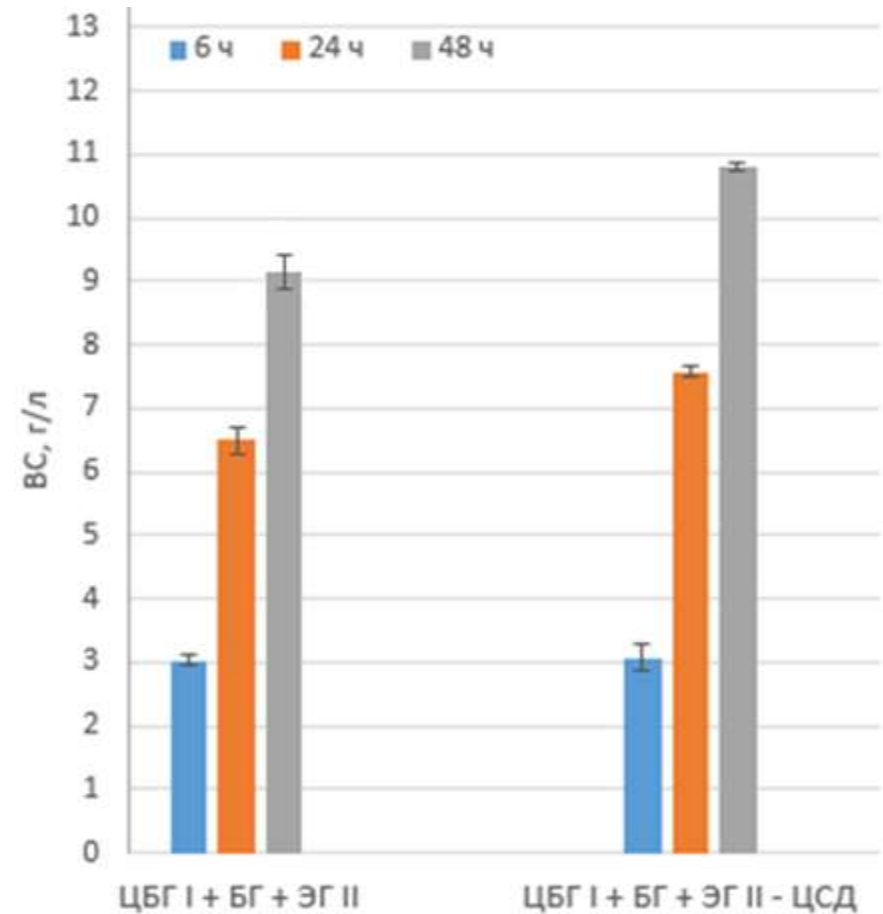
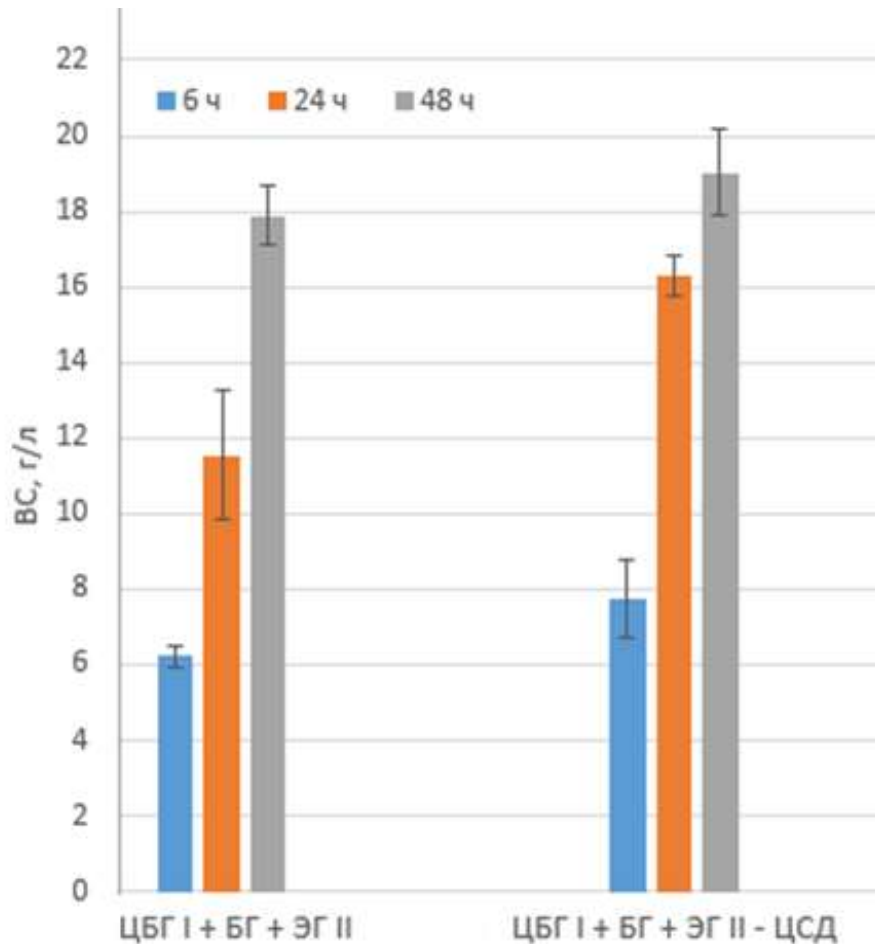
Белок	Показатель адсорбции, %
ЭГ II	0,0
ЭГ II - ЦСД	64 ± 5

Гидролитическая способность ЭГ II – ЦСД

Субстрат 100 г/л, 40°C, рН 5, 900 об/мин

Измельченная осина

МКЦ



Выводы

- Ген *egIII-cbhl^{cbd}*, кодирующий фермент ЭГ II – ЦСД, был клонирован и экспрессирован в штамме *Penicillium canescens*. Был получен сухой ферментный препарат с содержанием фермента ЭГ II - ЦСД 42% от общего белка.
- Была выделена гомогенная форма фермента ЭГ II – ЦСД. Активность ЭГ II – ЦСД по КМЦ составляла 13,4 ед/мг, что на 18% ниже активности ЭГ II без ЦСД; активность ЭГ II – ЦСД по β -глюкану составляла 16,0 ед/мг (на 14% ниже активности ЭГ II без ЦСД); активность ЭГ II – ЦСД по МКЦ составляла 0,06 ед/мг (в 20 раз выше активности ЭГ II без ЦСД)

Выводы

- Были определены каталитические параметры процесса гидролиза с помощью химерного белка ЭГ II – ЦСД. Константа Михаэлиса по КМЦ составляла 8,0 г/л, что на 15,6 ниже, чем у ЭГ II без ЦСД. Каталитическая константа для ЭГ II – ЦСД составляла 11,1 г/л по КМЦ (в 4,6 раза ниже, чем у ЭГ II).
- Тип ингибирования фермента целлобиозой ЭГ II – ЦСД был определен как конкурентный, значение константы ингибирования составляло 0,013 ммоль, что существенно не отличается от значений для ЭГ II без ЦСД.
- Показатель адсорбции ЭГ II – ЦСД составлял 64%, для ЭГ II адсорбции не наблюдалось.
- Осахаривающая способность ЭГ II – ЦСД в смеси с ЦБГ и БГЛ оказалась выше, чем у ЭГ II: концентрация восстанавливающих сахаров в смеси после 48-ми часового гидролиза МКЦ и измельченной осиновой древесины была выше, чем при использовании ЭГ II, на 6,1 и 18,7% соответственно.

Спасибо за внимание!