(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 038719 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.10.08

(21) Номер заявки
201790503

(22) Дата подачи заявки
2015.08.24

(51) Int. Cl. *C12N 9/42* (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

(54) ПОЛИПЕПТИДЫ, ОБЛАДАЮЩИЕ КСИЛАНАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, С БОЛЬШОЙ ГЛУБИНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ПОЛИСАХАРИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ КСИЛОЗУ

(31) **14003017.2**
(32) **2014.09.02**
(33) **EP**
(43) **2017.07.31**
(86) **PCT/EP2015/069351**
(87) **WO 2016/034449 2016.03.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КЛАРИАНТ ПРОДУКТЕ (ДОЙЧЛАНД) ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Райзингер Кристоф, Гамауф Кристиан, Краус Михаэль, Унтерштрассер Изабель (DE), Митрович Александра, Глидер Антон (AT)

(74) Представитель:
Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)

(56) WO-A1-9727290
US-A1-2014227761
EP-A1-2336152
ELISASHVILI VLADIMIR ET AL.: "Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia", WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 25, no. 2, 6 November 2008 (2008-11-06), pages 331-339, XP019690906, ISSN: 1573-0972 the whole document

(57) В изобретении предлагаются новый полипептид, обладающий ксиланазной активностью, кодирующая его нуклеиновая кислота, а также экспрессионный вектор, содержащий эту нуклеиновую кислоту, и клетка-хозяин, трансформированная этим вектором. Кроме того, в соответствии с данным изобретением предлагается способ получения указанного полипептида, композиция, содержащая полипептид по данному изобретению, и применение этого полипептида для ферментативной деградации лигноцеллюлозной биомассы. Полипептид по изобретению позволяет превратить по меньшей мере 60% (мас./мас.) ксилозосодержащих полисахаридов пшеничной соломы, которая была предварительно подвергнута нейтральной паровзрывной обработке, в ксилозу и/или ксилозосодержащие олигосахариды и глюкозу.

038719 B1

038719 B1

В изобретении предлагаются новые полипептиды, обладающие ксиланазной активностью, и соответствующие нуклеотидные последовательности, кодирующие эти полипептиды, а также векторы, содержащие указные нуклеотидные последовательности, и клетки-хозяева, трансформированные указанными векторами. Кроме того, данным изобретением предлагается способ получения указанных полипептидов и композиция, содержащая изобретенные полипептиды.

Гемицеллюлозы и, в частности, полисахариды, содержащие ксилан, являются ценным источником для получения моносахаридов, которые могут быть превращены в биологическое топливо, базовые химические вещества (молекулы-платформы), потребительские товары, пищевые продукты и добавки к пище. Ввиду того, что химическая структура такого материала неоднородна, требуется ряд физико-химических и/или ферментативных этапов обработки. Весьма желательно располагать способами, обеспечивающими эффективный полный или избирательный гидролиз полисахаридов, содержащих пентозы.

Важным источником пентоз в биомассе является ксилан. Ксилан составляет 15-25% (мас./мас.) лигноцеллюлозной биомассы и до 70% (мас./мас.) других сырьевых материалов, например овсяной шелухи. Ксиланы служат одним из основных компонентов стенки растительных клеток и на них приходится большая часть сельскохозяйственных отходов вроде пшеничной или кукурузной соломы и кочерыжек кукурузных початков, а также семян хлопчатника. Ксилан образован остатками ксилозы, связанными посредством β-1-4-гликозидных связей в сложный полимер с различными другими компонентами, например арабинозой, глюкуроновой кислотой, метилглюкуроновой кислотой и ацетильными группами. В злаках ксиланы часто содержат боковые цепи из L-арабинофуранозида, содержащего α-1,2- и/или α-1,3-связи. Такие замещенные ксиланы обычно называют арабиноксиланами. Ксиланы, замещенные глюкозой, обычно назвают глюкоксиланами. Существуют и смешанные формы таких ксиланов.

Ксиланазы (β-1,3- или β-1,4-кисланксилогидролазы; E.C. 3.2.1.8) - это ксиланолитические ферменты, деполимеризующие ксиланы, арабинокисланы и/или другие полисахариды, содержащие ксилозу. Эндоксиланазы (например, эндо-β-1,4-ксиланаза) гидролизуют в молекулах ксиланов, арабиноксиланов и/или других полисахаридах, содержащих ксилозу, внутренние β-гликозидные связи с образованием ксилоолигомеров с меньшей молекулярной массой или мономерных молекул ксилозы.

В настоящее время ксиланаза широко используется в промышленности, например в производстве бумажной массы и бумаги для улучшения отбеливаемости бумажной массы и в пищевой промышленности для получения ксилозы с целью ее использования в качестве основы для производства подсластителя ксилита. Также ксиланаза может использоваться в пищевых продуктах и кормах, в состав которых входят злаки (например, ячмень, пшеница, кукуруза, рис, тритикале или овес) или же побочные продукт переработки злаков, богатые ксиланами, арабиноксиланами и/или гликоксиланами. Добавление ксиланазы в корма для животных или в хлебопекарные продукты способствует расщеплению стенок растительных клеток, в результате чего улучшается утилизация растительных питательных веществ и/или продлевается сохранение свежести хлеба, соответственно. Ксиланаза в составе кормов для животных способствует быстрому росту и переработке пищи. Кроме того, вязкость корма, в состав которого входит ксилан, благодаря ксиланазе снижается, в результате чего улучшаются приемлемость и усвоение продукта.

Несмотря на относительно большое количество известных ксиланаз бактерий и грибов, остается ограниченным количество ксиланаз, которые подходят не только для указанной цели, но и для промышленного применения (и, соответственно, экономически выгодны). Это обусловлено, главным образом, тем, что используются специфические физические условия в процессе, например высокая температура и определенный pH, а также тем, что у конкретных ксиланаз может отсутствовать избирательность к субстрату и/или продукту и совместимость, приводя к низкой глубине переработки. Такие недостатки ограничивают применение ксиланаз.

Все большую важность приобретает превращение биомассы, например биомассы, содержащей целлюлозу и лигноцеллюлозу, различного происхождения, поэтому растет потребность в ксиланазах, обеспечивающих эффективную и применимую в промышленности переработку биомассы. В европейском патенте № 2336152 описываются высокоэффективные ксиланазы, обладающие повышенной термостабильностью. Однако для еще большего увеличения эффективности производства и очистки продукта обязательно нужны дополнительные усовершенствования.

В связи с этим авторы данного изобретения поставили перед собой задачу разработать новые ксиланазы, обеспечивающие эффективное получение продукта благодаря большой глубине переработки трудно разлагаемых субстратов, например полисахаридов, содержащих ксилозу. Кроме того, в силу высокой совместимости с субстратом и способности к синергическому взаимодействию с другими ферментами должна достигаться дальнейшая интенсификация переработки и снижение ее стоимости. Наконец, ксиланазы должны также обладать высокой термо- и pH-стабильностью.

Авторы данного изобретения неожиданно обнаружили, что указанная задача может быть решена с помощью полипептидов, обладающих ксиланазной активностью с большой глубиной переработки полисахаридов, содержащих ксилозу, причем аминокислотная последовательность у этих полипептидов по меньшей мере на 75% идентична последовательности, представленной в настоящем документе как SEQ ID NO: 2.

Термин "ксиланазная активность" относится ко всем полипептидам, способным катализировать гидролиз β-1,3- или β-1,4-связей с высвобождением соединений с меньшей молекулярной массой - ксилоолигомеров или мономеров ксилозы. В настоящем документе термин "ксиланаза" означает β-1,3- или β-1,4-ксиланксилогидролазу (код фермента по международной классификации (E.C.) 3.2.1.8).

Термин "полисахариды, содержащие ксилозу" относится к любому субстрату, содержащему олигомеры ксилозы, например ксилотетранозу, ксилопентанозу, ксилогексанозу, или полимеры ксилозы, например ксилан или гемицеллюлозу. Примерами полисахаридов, содержащих ксилозу, являются пшеничная солома, дерево, солома и/или шелуха злаков, стебли кукурузы, жом сахарного тростника (багасса), овсяная шелуха, лозное просо, целлюлоза, необработанная бумажная масса (полученная при производстве бумаги), их смеси и другие растительные материалы, содержащие лигноцеллюлозу.

В настоящем документе названия аминокислот, пептидов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот соответствуют рекомендациям Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC). Как правило, в настоящем документе используется однобуквенное обозначение аминокислот.

Термин "большая глубина переработки полисахаридов, содержащих ксилозу" относится к способности полипептида превращать по меньшей мере 60% (мас./мас.) полисахаридов, содержащих ксилозу, определенного субстрата в ксилозу и/или олигосахариды, содержащие ксилозу, и глюкозу, предпочтительно по меньшей мере 70% (мас./мас.), более предпочтительно по меньшей мере 75% (мас./мас.), еще более предпочтительно по меньшей мере 80% (мас./мас.), особенно предпочтительно по меньшей мере 85% (мас./мас.) и наиболее предпочтительно по меньшей мере 90% (мас./мас.), когда на подвергнутую нейтральной паровзрывной обработке пшеничную солому воздействуют указанным полипептидом при pH 5 и температуре 50°C в течение 24 ч.

В одном из более предпочтительных воплощений данного изобретения полипептиды по изобретению гидролизуют полисахариды, содержащие ксилозу, до ксилозы и/или олигосахаридов, содержащих ксилозу, и мономеров глюкозы в соотношении (мас./мас.) по меньшей мере 5:1, предпочтительно 7:1 и наиболее предпочтительно 10:1, когда на подтвергнутую нейтральной паровзрывной обработке пшеничную солому воздействуют указанным полипептидом при pH 5 и температуре 50°C в течение 24 ч.

Полипептид по данному изобретению содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, особенно предпочтительно по меньшей мере на 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, также предпочтительно по меньшей мере на 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 98% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 2.

Полипептид по данному изобретению предпочтительно содержит сигнальный пептид, который отщепляется в процессе секреции в супернатант.

Полипептид по данному изобретению содержит полипептидную цепь, состоящую из предпочтительно более 250 аминокислотных остатков. Более предпочтительно длина указанного полипептида составляет от 290 до 500 аминокислотных остатков, еще более предпочтительно от 320 до 400 аминокислотных остатков. Наиболее предпочтительно полипептид по данному изобретению состоит из 379-390 аминокислотных остатков.

Полипептид по данному изобретению имеет молекулярную массу предпочтительно более 30 кДа. Более предпочтительно его размеры составляют от 32 до 45 кДа, еще более предпочтительно от 34,5 до 42,5 кДа. Наиболее предпочтительно размеры указанного полипептида составляют от 34,5 до 42,5 кДа. Наиболее предпочтительно, когда размеры указанного полипептида составляют от 40 до 42 кДа. Особенно подходящий размер для не модифицированной молекулы полипептида по данному изобретению 41,9 кДа.

Также особенно предпочтительно, когда аминокислотная последовательность полипептида по данному изобретению представляет собой последовательность, представленную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, в которой от 1 до 30 аминокислотных остатков заменены, отсутствуют или вставлены (все эти изменения называются мутациями).

Особенно предпочтительны по данному изобретению варианты белка с последовательностью SEQ ID NO: 2. Вариантами белка являются полипептиды, у которых аминокислотная последовательность отличается в одном или более положениях от последовательности исходного белка, причем эти отличия могут быть заменами одного аминокислотного остатка другим, делециями одного или нескольких аминокислотных остатков или вставками дополнительных аминокислотных остатков или цепочки аминокислотных остатков в исходную последовательность. По определению варианты исходного полипептида отличаются от других полипептидов при сравнении идентичности аминокислотных последовательностей (при выравнивании) с использованием алгоритма ClustalW Algorithm (см. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. and Higgins D.G. (2007) ClustalW and ClustalX version 2. Bioinformatics 2007 23(21): 2947-2948). Способы получения таких вариантов белка включают случайный или сайт-направленный мутагенез, сайт-насыщающий мутагенез, сборку фрагментов с использованием ПЦР, перетасовку ДНК, гомологичную рекомбинацию in vitro или in vivo и способы синтеза генов.

Замены отдельных аминокислотных остатков описываются следующим образом: сначала стоит однобуквенное обозначение исходного аминокислотного остатка, затем его положение (номер) в аминокислотной цепи и затем однобуквенное обозначение вставшего на его место аминокислотного остатка, например замена глутамина в положении 1 на лейцин описывается как "Q1L". В случае делеции отдельных позиций из последовательности однобуквенное обозначение аминокислотного остатка замещают трехбуквенным сокращением "del", таким образом, делеция глутамина в положении 3 описывается как Q3del. Вставка дополнительных аминокислотных остатков получает номер предшествующей позиции, дополненный строчной буквой по порядку алфавита относительно расстояния до точки их вставки. Так, инсерция двух остатков триптофана после аминокислотного остатка, занимающего положение 3 в аминокислотной цепи, описывается как 3aW, 3bW. Встраивание не транслируемых кодонов TAA, TGA и TAG в нуклеотидную последовательность обозначается "*" в аминокислотной последовательности; так, включение терминирующего кодона в положение 4 аминокислотной последовательности описывается как T4*.

Множественные мутации разделяются значком +, или косой чертой, или запятой. Например, две мутации, состоящие в замене аланина в положении 20 и глутаминовой кислоты в положении 21 на глицин и серин, соответственно, изображаются следующим образом: "V20G+S21T", или "V20G/S21T", или "V20G, S21T".

Когда один аминокислотный остаток в данном положении заменяется одним из двух или более других аминокислотных остатков, эти последние при обозначении аминокислотной последовательности разделяются запятой или косой чертой. Например, замена аланина в положении 30 на глицин либо на глутаминовую кислоту изображается следующим образом: "V20G,E", или "V20G/E", или "V20G, V20E".

Когда положение, подходящее для мутации, идентифицируют в настоящем документе без указания какой-либо определенной мутации, это следует понимать так, что аминокислотный остаток в данном положении может быть заменен на любой другой аминокислотный остаток. Так, например, если упоминается мутация в положении 20, где в исходной последовательности стоит остаток валина, но не оговаривается, на какую именно аминокислоту он заменен, то это следует понимать таким образом, что этот аминокислотный остаток может быть делетирован или заменен на остаток любой другой аминокислоты (т.е. любой из обозначаемых R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y и V).

Термин "похожая мутация" или, например, "похожая замена" относится к таким аминокислотным мутациям, которые специалист в данной области техники сочтет сходными с первой мутацией. В данном контексте имеется в виду сходство по химическим свойствам аминокислот. Если, например, мутация в определенном положении состоит в замене остатка не алифатической аминокислоты (например, серина) на остаток алифатической аминокислоты (например, лейцина), то сходной мутацией будет такая, которая состоит в замене в том же положении на другую алифатическую аминокислоту (например, изолейцин или валин). Кроме того, характеристики аминокислот включают размер аминокислотного остатка, его гидрофобность, полярность, заряд, значение pK и другие известные в данной области техники свойства. Соответственно, сходная мутация может представлять собой замену основной аминокислоты на основную, кислотной на кислотную, полярной на полярную и проч. Получающиеся таким образом наборы аминокислот являются, скорее всего, консервативными по структурным причинам. Эти наборы можно описать при помощи диаграммы Венна. Похожие замены могут быть, например, в следующих группах аминокислот: гидрофобные (F W Y H K M I L V A G), ароматические (F W Y H), алифатические (I L V), полярные (W Y H K R E D C S T N), заряженные (H K R E D) - из них положительно заряженные (H K R), отрицательно заряженные (E D).

По общепринятой нумерации аминокислотных остатков и обозначению вариантов белков для описания вариантов белка первый остаток глутамина (Q) аминокислотной последовательности QAQTWG в исходной аминокислотной последовательности полипептида, представленной как SEQ ID NO: 4, обозначается как номер положения 1, или аминокислотный остаток обозначается Q1, или глутамин 1. Нумерация всех аминокислотных остатков будет соответствовать их положению в исходной последовательности, представленной как SEQ ID NO: 2, относительно этого положения 1.

В одном из особенно предпочтительных воплощений данного изобретения предлагается новый полипептид FfXyn1 (SEQ ID NO: 2). Кроме того, в особенно предпочтительных воплощениях данного изобретения предлагаются полипептиды mFfXyn1 (SEQ ID NO: 4), содержащие соответствующий зрелый белок, а также слитый с N-концевыми сигнальными пептидами, например кодируемые нуклеотидными.

Полипептиды по данному изобретению также отличаются стабильностью при тепловой обработке с относительно высокой температурой. Предпочтительно, чтобы после инкубации в фосфатном буферном растворе (50 мМ) при температуре 50°C в течение 4 ч полипептиды по данному изобретению сохраняли по меньшей мере 80%, предпочтительнее более чем 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90%, в частности по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно 99% своей ксиланазной активности.

Активность полипептидов по данному изобретению при повышенной температуре определяли путем измерения степени гидролиза ксилана при различной температуре в течение определенного промежутка времени в следующих условиях: pH 5; концентрация субстрата 2% (мас./мас.)в расчете на сухой вес; отношение фермент:ксилан (E/S) 1% (мас./мас.) в расчете на сухой вес.

Полипептиды по данному изобретению проявляют оптимальную ксиланазную активность в диапазоне температур от 40 до 77°C. Наиболее предпочтительно, когда полипептиды по данному изобретению проявляют ксиланазную активность в диапазоне температур от 45 до 70°C и наиболее предпочтительно от 50 до 65°C. В данном контексте термин "оптимальная ксиланазная активность" следует понимать следующим образом: когда фермент инкубируют с ксиланом в течение 30 мин при pH 5, данной температуре соответствует наибольшее высвобождение восстанавливающих концевых сахарных остатков.

Полипептиды по данному изобретению также отличаются широким диапазоном pH, в котором они активны. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемые полипептиды активны в диапазоне pH от 5,0 до 5,5, более предпочтительно от 4,0 до 6,0 и наиболее предпочтительно от 3,5 до 8,5. Выражение "активен при таком-то pH" следует понимать следующим образом: при данном pH фермент сохраняет как минимум 10% активности по сравнению с его активностью при инкубации с ксиланом в течение 30 мин при температуре 50°C.

Полипептиды по данному изобретению также отличаются высокой стабильностью к действию протеаз. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемые полипептиды после воздействия трипсина при pH 7,8 и температуре 50°C в течение 1 ч сохраняют по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 85%, особенно предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% своей ксиланазной активности.

В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемые полипептиды после воздействия пепсина при pH 3 и температуре 37°C в течение 2 ч сохраняют по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 85%, особенно предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% своей ксиланазной активности.

Полипептиды по данному изобретению также отличаются высоким уровнем экспрессии и секреции различными микроорганизмами, в частности секрецией клетками-хозяевами грибов и/или дрожжей. Более предпочтительно, когда после введения промотора, функционально связанного с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид по данному изобретению, в подходящие для его экспрессии клетки-хозяева этот полипепетид экспрессируется и секретируется на уровне выше 100 мг/л, предпочтительно на уровне выше 500 мг/л, особенно предпочтительно на уровне выше 750 мг/л, еще более предпочтительно на уровне 1 г/л и наиболее предпочтительно на уровне 1,25 г/л. Предпочтительны промоторы, описанные в настоящей заявке.

Пригодные клетки-хозяева - это предпочтительно дрожжевые клетки, более предпочтительно клетки дрожжей родов Saccharomyces, Kluyveromyces, Schizosaccharomyces, Candida, Yarrowia, Komagataella, Pichia, Hansenula; в частности, выбираемые из группы Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces marxianus, Yarrowina lipolytica, Hansenula polymorpha, Pichia angusta, Komagataella pastoris и Pichia pastoris.

Другими клетками-хозяевами, подходящими для экспрессии полипептидов по данному изобретению, являются бактериальные клетки. Особенно подходят в качестве клеток-хозяев для экспрессии полипептидов по данному изобретению Lactococcus lactis, Lactobacillus brevis, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Bacillus lentus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus licheniformis, Pseudomonas fluorescence, Klebsiella planticola и Escherichia coli.

Другими подходящими для экспрессии полипептидов по данному изобретению клетками-хозяевами, являются клетки грибов, выбираемых из родов Penicillium, Trichoderma, Hypocrea, Aspergillus, Cantharellu, Boletos, Agraicus, Pleurotus, Trametes, Phanerochaete, Myceliophthora, Chaetomium, Humicola, Chrysosporium, Talaromyces и Neurospora. Особенно подходящими в качестве клеток-хозяев для экспрессии полипептидов по данному изобретению являются клетки Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Aspergillus nidulans, Penicillium chrysogenum, Trichoderma reesei, Myceliophthora thermophila, Chrysosporium lucknowense, Trichoderma viridae, Trichoderma harzianum, Hypocaea pseudokonigii и Talaromyces emersonii.

Методы определения способности к экспрессии, т.е. количества секретируемого белка-продукта и/или фермента в супернатант культуры клеток-хозяев, известны специалистам в данной области техники.

Данным изобретением также предлагаются нуклеиновые кислоты (нуклеотидные последовательности), кодирующие полипептиды по данному изобретению, аминокислотная последовательность которых по меньшей мере на 85% идентична последовательностям, представленным как SEQ ID NO: 1, NO: 3, NO: 5 или NO: 6. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения предлагается нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 92%, также предпочтительно по меньшей мере на 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 98% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 99% идентична последовательности, представленной как SEQ ID NO: 1 (кодирующей белок FfXyn1) в исходной форме и в зрелой форме (SEQ ID NO: 3), а также продукты слияния с сигнальными пептидами для усиления гетерологичной продукции в клетках мицелиальных грибов Trichoderma reesei (SEQ ID NO: 5) и дрожжей, например Saccharomyces cerevisiae (SEQ ID NO: 6).

В одном из более предпочтительных воплощений данного изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая предлагаемый полипептид, представляет собой последовательность SEQ ID NO:

1, NO: 3, NO: 5 или NO: 6, в которой от 1 до 30 нуклеотидов заменены, отсутствуют или вставлены (все эти изменения называются мутациями). Особенно предпочтительны мутации в тех частях нуклеотидной последовательности, которые определяют структуру белка и/или его активного центра ксиланазы.

Термин "мутация" в настоящем документе включает любые изменения в нуклеотидной последовательности, включая инсерции, делеции, точковые мутации, инверсии или их комбинации. Соответственно употребляются определения в отношении изменений и мутаций аминокислотной последовательности.

В данном изобретении также предлагаются векторы, содержащие нуклеотидные последовательности по данному изобретению. Соответственно употребляются определения в отношении нуклеотидных последовательностей по данному изобретению.

Примерами эписомных векторов являются производные бактериальных плазмид, дрожжевых плазмид, линейные ДНК с центромерами, конструкции вирусного происхождения (например, SV40), фаговых ДНК, ДНК-векторов на основе автономно реплицирующихся последовательностей грибного происхождения, бакуловирусов, вируса осповакцины, аденовирусов, вируса оспы домашней птицы, вируса псевдобешенства, а также векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговой или вирусной ДНК.

Векторы, пригодные для экспрессии полипептидов по данному изобретению, могут включать один или более генетических элементов, транслируемых вместе с нуклеотидной последовательностью по данному изобретению, таких, как промоторные последовательности, сайты инициации транскрипции, элементы для инициации трансляции и функциональные элементы для транспорта продуцируемого белка.

Вектор по данному изобретению может кодировать более одного полипептида, в том числе более одной ксиланазы, или он может кодировать слитый полипептид, включающий ксиланазу по данному изобретению.

Вектор по данному изобретению может существовать в клетке-хозяине как эписома или быть интегрированным в хозяйскую хромосому.

Данным изобретением также предлагаются клетки-хозяева, трансформированные вектором по данному изобретению. Клетки-хозяева по данному изобретению можно использовать для производства рекомбинантного белка или для превращения содержащих ксилозу субстратов метаболизма в предпочтительные метаболиты.

Рекомбинантные клетки-хозяева по данному изобретению предпочтительно выбирают из бактерий, грибов и/или дрожжей. В одном из особенно предпочтительных воплощений данного изобретения клетки-хозяева выбирают из группы, состоящей из Escherichia, Klebsiella, Pseudomonas, Lactobacillus, Bacillus, Streptomyces; Saccharomyces, Kluyveromyces, Schizosaccharomyces, Candida, Yarrowia, Komagataella, Pichia, Hansenula, Penicillium, Trichoderma, Hypocrea, Aspergillus, Cantharellu, Agraicus, Boletos, Pleurotus, Trametes, Phanerochaete, Myceliophthora. Chaetomium, Humicola, Chrysosporium, Talaromyces и Neurospora.

Клетки-хозяева предпочтительно выбирают из Lactococcus lactis, Lactobacillus brevis, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Bacillus lentus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus licheniformis, Pseudomonas fluorescence, Klebsiella planticola, Escherichia coli, Streptomyces lividans, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces marxianus, Yarrowina lipolytica, Hansenula polymorpha, Pichia angusta, Komagataella pastoris, Pichia pastoris, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Trichoderma reesei и Myceliophthora thermophile.

Рекомбинантные клетки-хозяева по данному изобретению могут содержать один или более векторов по данному изобретению.

В другом своем аспекте данное изобретение включает экспрессионные кассеты, обеспечивающие экспрессию полипептидов по данному изобретению, в частности белка FfXyn1 in vivo или in vitro.

Экспрессионная кассета предпочтительно содержит промоторный участок, расположенный в сторону 3'-конца от кодирующей последовательности гена, кодирующего полипептид по данному изобретению, предпочтительно гена FfXyn1; сайты, участвующие в формировании комплекса инициации трансляции; при необходимости регуляторные последовательности, например сайты связывания репрессора или энхансера, и при необходимости сайт терминации транскрипции. Промоторы могут содержать последовательности, обеспечивающие связывание белковых факторов, требующихся для транскрипции кодирующей последовательности, или функциональной матричной РНК. Также последовательности промотора могут влиять на эффективность транскрипции в данных физиологических или химических условиях. Промотор может содержать элементы, действующие как энхансеры, которые находятся очень близко от кодирующей области или же расположены в более удаленных местах. Промоторы могут быть прокариотического, эукариотического, архейного или вирусного происхождения либо они синтетические. Предпочтительные по данному изобретению промоторы включают бактериальные промоторы гена β-галактозидазы (lacZ), промотор триптофанового оперона (trp), промотор гена устойчивости к тетрациклину (tet), промотор araBAD, промоторы вирусов T7, T3, PL или PR. Предпочтительные промоторы для экспрессии полипептидов по данному изобретению в дрожжевых клетках включают промотор гена глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (GAP) промотор гена гексокиназы, промотор гена алкогольдегидрогеназы ADE2, GAL1, GAL10, TEF и промоторы метаболического пути превращений метанола, имеющиеся у метилотрофных дрожжей (например, AOXI, MOXI или FMDH), а также промотор, индуцируемый медью (CUP1). Предпочтительные промоторы для экспрессии полипептидов по данному изобрете-

нию в клетках мицелиальных грибов включают промоторы генов ферментов, расщепляющих целлюлозу, например целлобиогидролазы-1 (CBHI), целлобиогидролазы-II (CBHII), или эндоглюканазы-I (EGI), или эндоглюканазы-II (EGII), амилазы, глюкоамилазы, фосфоглицераткиназы (pgk), или промоторы генов белков, участвующих в гликолизе.

Уровень экспрессии гена, кодирующего полипептид по данному изобретению, можно повысить путем подбора числа копий этого гена, вводимых в клетки-хозяева; предпочтительно, чтобы в результате в клетках было более чем одна его копия. Для оптимизации экспрессии гена, кодирующего полипептид по данному изобретению, можно использовать промотор, регулируемый путем индукции после добавления химического агента-индуктора или путем подбора физических условий. Примеры индуцируемых систем включают систему с репрессором, зависимым от тетрациклина, систему с лактозным репрессором или зависимый от температуры промотор PL бактериофага лямбда. Или же можно использовать дерепрессию промотора путем достижения определенного физиологического состояния культуры клеток (например, в случае промотора гена щелочной фосфатазы E. coli (PhoA), промотора триптофанового оперона (Trp) E. coli, промотора гена алкогольдегидрогеназы 2 (Adh2), промотора гена формилметанофурандегидрогеназы (Fmdh), промотора гена целлобиогидролазы (CBHI)). В других ситуациях может быть предпочтительным использование сильных промоторов стационарной фазы роста (например, промотора гена глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (GAP), промотор гена тиротрофного эмбрионального фактора транскрипции (TEF)).

Для направления экспрессируемого полипептида по данному изобретению в компартменты клетки, органеллы или "на экспорт" из клетки хозяина может использоваться присоединение сигнальных аминокислотных последовательностей. Сигнальные последовательности хорошо известны в данной области техники. Примерами являются лидерные последовательности, служащие для направления в периплазму белков OmpA и OmpT, пектатлиазы B (PelB) фосфатазы A (PhoA) глюканазы или β-лактамазы. Сигнальные пептиды, нужные для секреции белков, встречаются среди природных секретируемых ферментов, модифицирующих углеводы, а именно лидерные участки последовательностей, кодирующих целлобиогидролазу, эндоглюканазы, амилазы (amyE) или сигнальные пептиды полового фактора, секретируемого дрожжевыми клетками α-типа спаривания (Mf-α Saccharomyces cerevisiae), или лизоцима куриного яйца.

Экспрессионная кассета может быть размещена в векторе или векторной конструкции по данному изобретению, которые могут существовать в клетке-хозяине как эписома или же быть интегрированными в хозяйскую хромосому. Примеры известных векторов - это производные бактериальных плазмид, дрожжевых плазмид, линейных ДНК с центромерами, конструкций вирусного происхождения (например, SV40), фаговых ДНК, бакуловирусов, вируса осповакцины, аденовирусов, вируса оспы домашней птицы, вируса псевдобешенства, а также векторов, полученных из комбинаций плазмид и фаговой или вирусной ДНК. Интеграция экспрессионной кассеты в клеточный геном может достигаться путем гомологичной рекомбинации, транспозиции или с помощью вирусных систем интеграции. Кроме того, возможно использование существующих как эписома конструкций в качестве основы для интеграции копий экспрессионной кассеты в хромосомную ДНК. Наконец, в качестве вектора или векторной конструкции пригодна любая система, обеспечивающая репликацию экспрессионной кассеты в клетках-хозяевах.

В одном из воплощений данного изобретения переносимая ДНК дополнительно содержит также открытые рамки считывания, кодирующие ферменты, причем эти рамки считывания могут быть физически связаны в непрерывные цепи ДНК или же представлены смесью отдельных цепочек ДНК. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения эти дополнительные открытые рамки считывания функционально связаны с промоторами или с регуляторными элементами ДНК, что ведет к совместной или по отдельности регулируемой экспрессии дополнительных открытых рамок считывания в трансформированных клетках-хозяевах. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения эти дополнительные открытые рамки считывания содержат по меньшей мере одну последовательность, выбираемую из нуклеотидных последовательностей, кодирующих эндоксиланазы, ксилоглюканазы, ксилозидазы, ацетилксиланэстеразы, эстеразы феруловой кислоты, эндоцеллюлазы, экзоцеллюлазы, арабинофуранозидазы, галактаназы, фитазы, монооксигеназы полисахаридов или арабиназы.

Предпочтительные методы для введения экспрессионной кассетной конструкции в клетки-хозяева включают трансформацию, трансфекцию, конъюгацию и/или интербридинг. Трансформация может осуществляться путем переноса ДНК в процессе электропорации, слияния протопластов, липофекции, бомбардировки микрочастицами, химической трансформации с использованием ацетата лития, хлорида кальция, полиэтиленгликоля или хлорида марганца. Другие подходы включают использование вирусных частиц. В качестве альтернативы возможно использование в качестве клеток-хозяев природных компетентных организмов.

Для дальнейшего увеличения выхода экспрессируемого белка применяются методы, включающие коэкспрессию с белками-помощниками, участвующими в трансляции, транспортировке белков, сворачивание белков (например, белков-шаперонов семейства hsp70, протеин-дисульфидизомеразы) или соответствующий процессинг полипептида (Kex-протеаза, Ste-протеазы) и других механизмах, участвующих в образовании белков в клетке.

После трансформации штамма организма-хозяина вектором по данному изобретению и роста культуры до нужной плотности клеток, выбранный индуцируемый промотор индуцируют изменением температуры или химически и клетки культивируют, чтобы они продуцировали рекомбинантный фермент. Предпочтительно, чтобы полипептид по данному изобретению образовывался с сигнальным пептидом, направляющим рекомбинантный белок по пути секреции из клетки-хозяина. Затем клетки удаляют путем центрифугирования или фильтрации, собирая супернатант, содержащий искомый полипептид.

Данным изобретением также предлагаются способы получения полипептидов по данному изобретению, включающие этапы:

a) получение клеток-хозяев, трансформированных вектором, содержащим нуклеиновую кислоту (нуклеотидную последовательность) по данному изобретению;

b) культивирование клеток-хозяев в условиях, в которых происходит экспрессия нужного полипептида; и

c) выделение этого полипептида.

В настоящем документе все определения, в частности определения, касающиеся полипептидов, клеток-хозяев, векторов и нуклеиновых кислот (нуклеотидных последовательностей), употребляются соответственно.

Культивирование клеток-хозяев по данному изобретению осуществляется с применением методов и условий, хорошо известных специалистам в данной области техники. Предпочтительно клетки-хозяева культивируют на субстрате из сельскохозяйственных отходов и/или отбросных вод. Сельскохозяйственные плотные и жидкие отходы получают на сельскохозяйственных объектах (фермах, лесоперерабатывающих предприятиях); они содержат часть собранного сырья, которая по физическим, химическим, экономическим или политическим причинам не может быть превращена в основной продукт. Например, для культивирования по данному изобретению субстратами могут служить пшеничная солома, жом сахарного тростника (багасса), листья сахарного тростника, свекловичный жом, необработанная бумажная масса, бумажные отходы, стружка или другие отходы лесозаводов. В одном из особенно предпочтительных воплощений данного изобретения субстрат для культивирования подвергают воздействию белка по данному изобретению до культивирования клеток или же делят на две части, из которых та, которая не используется для культивирования клеток, обрабатывается по меньшей мере белком по данному изобретению. В одном из особенно предпочтительных воплощений данного изобретения в процессе обработки субстрата для культивирования по меньшей мере белком по данному изобретению высвобождается фактор, индуцирующий трансформированные клетки-хозяева. Примерами таких индукторов являются ксилоза, глюкоза, арабиноза, рамноза и олигомеры, содержащие указанные сахара в качестве мономеров.

Выделение полипептидов по данному изобретению осуществляется с применением методов и условий, хорошо известных специалистам в данной области техники. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения искомый фермент выделяют из супернатанта и очищают, применяя методы, включающие осаждение сульфатом аммония или этиловым спиртом, кислотную экстракцию, анионо- или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, гидрофобную хроматографию, аффинную хроматографию (в том числе с использованием лектина) и хроматографию на гидроксилапатите. В особенно предпочтительных воплощениях данного изобретения используются этапы с рефолдингом полипептидной цепи белка.

В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения клетками-хозяевами служат дрожжевые клетки, и ксиланаза имеет аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 2 или NO: 4, причем в особенно предпочтительном воплощении от 1 до 30 аминокислотных остатков в ней заменены, отсутствуют или вставлены. В одном из особенно предпочтительных воплощений данного изобретения ксиланаза снабжена аффинной меткой, например пептидом из шести остатков гистидина (6x-His TAG).

Данным изобретением также предлагается композиция, содержащая полипептид по данному изобретению. Предлагаемая композиция содержит предпочтительно от 0,01% (мас./мас.) до 50% (мас./мас.) (относительно суммарного количества белка в композиции), более предпочтительно от 1 до 35% (мас./мас.), особенно предпочтительно от 5 до 20% (мас./мас.), наиболее предпочтительно от 8 до 12,5% (мас./мас.) полипептида по данному изобретению.

В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения указанная композиция также содержит по меньшей мере одну целлюлазу. Эту по меньшей мере одну целлюлазу предпочтительно выбирают из смеси целлюлаз, полученной из культур соответствующих микроорганизмов, секретирующих целлюлазу. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения культуру микроорганизмов для этой цели выбирают из культур Trichoderma reesei, Myceliophthora thermophila, Talaromyces emersonii, Trichoderma viride, Penicillium verruculosum, Talaromyces stripitatus, Humicula grisaea, Chaethomium thermophilum, Humicola inculens, Clostridium thermocellum,Thermobifida fusca, Caldicellulosiruptor owenensis, Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger, Neurospora crassa и их смесей.

В одном из более предпочтительных воплощений данного изобретения указанная композиция содержит одну или более ферментативных активностей белков, выбираемых из целлюлаз, пиранозамонооксигеназ GH61 (также называемых "белки GH61"), эндоксиланаз, ксилоглюканаз, ксилозидаз аце-

тилксиланэстераз, эстераз феруловой кислоты, β-глюкозидаз, арабинофуранозидаз, галактаназ и арабиназ.

В одном из особенно предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемая композиция находится в смеси целлюлаз, тем самым усиливая гидролиз целлюлозы, ксилана и других гемицеллюлозных соединений. В одном из наиболее предпочтительных воплощений данного изобретения в смеси целлюлаз уровень ферментативной активности одного или более белков, выбираемых из группы белка GH61, ксилозидазы и β-глюкозидазы, повышен на 5% или более относительно удельной активности смеси целлюлаз.

Особенно предпочтительные композиции содержат полипептид по данному изобретению, как описано выше, по меньшей мере одну целлюлазу, как описано выше, а также по меньшей мере одну эндоглюканазу IV, причем особенно предпочтительно, чтобы фракция полипептида по данному изобретению и эндоглюканазы IV составляла от 5% (мас./мас.; определение белка по Брэдфорду, стандарт - бычий сывороточный альбумин (BSA)) полипептида до 40% (мас./мас.) эндоглюканазы IV, предпочтительно от 8% полипептида до 25% эндоглюканазы IV, причем проценты рассчитываются относительно всего количества белка в композиции, которая состоит предпочтительно из целлюлазы. Также предпочтительно, чтобы полипептид по данному изобретению и эндоглюканаза содержались в композиции в одинаковом количестве.

В одном из более предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемая композиция содержит полипептид по данному изобретению, как описано выше, по меньшей мере одну целлюлазу, как описано выше, а также по меньшей мере одну ксилозидазу и/или по меньшей мере один белок GH61. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемая композиция содержит от 30% (мас./мас.; определение белка по Брэдфорду, стандарт - BSA) до 99% (мас./мас.; определение белка по Брэдфорду, стандарт - BSA), предпочтительно от 40 до 90%, более предпочтительно от 50 до 80% целлюлазы; от 1 до 70% (мас./мас.; определение белка по Брэдфорду, стандарт- BSA), предпочтительно от 5 до 50%, еще более предпочтительно от 10 до 30% и наиболее предпочтительно от 15 до 20% полипептида по данному изобретению; количество ксилозидазы и/или белка GH61 составляет от 1 до 25% (мас./мас.; определение белка по Брэдфорду, стандарт - BSA), предпочтительно от 5 до 20% и наиболее предпочтительно от 10 до 15%.

Данным изобретением предлагается также применение полипептидов и композиций по данному изобретению для ферментативной деградации лигноцеллюлозной биомассы.

Данное изобретение также относится к применению полипептидов по данному изобретению в процессах получения биологического топлива, бумажной массы, бумаги и целлюлозного волокна, базовых химических веществ, пищевых продуктов и кормов из таких сложных субстратов, как полисахариды, содержащие ксилозу.

Примеры и фигуры

Далее данное изобретение описывается с помощью примеров и фигур. Эти примеры и фигуры следует считать служащими лишь иллюстративной цели и ни в каком отношении не ограничивающими объем данного изобретения и его формулы.

Пример 1. Оптимальная температура и диапазон pH.

Было проведено определение сродства полипептида tFfXyn1 (SEQ ID NO: 7) на предмет оптимальной активности в диапазоне pH от 4 до 7, а также определяли остаточную активность после инкубации при температуре от 40 до 65°C время преинкубации. Для определения уровня активности в качестве субстрата использовали паранитрофенил-β-D-ксилопиранозид (pNP-X) в концентрации 2 мг/мл. Температуру устанавливали 50°C, время инкубации составляло 1 ч. Остаточную активность определяли после этапа тепловой преинкубации при pH 5. Для определения оптимального pH использовали буферные растворы, представленные в таблице. Высвобождение паранитрофенола определяли, измеряя поглощение на длине волны 405 нм. Количество белка определяли по Брэдфорду с BSA в качестве стандарта. Растворы очищенного полипептида tFfXyn1 концентрацией 2 мг/мл готовили на соответствующих буферных растворах.

Состав буферных растворов для определения оптимального pH

pH	мМ	
4	100	Молочная кислота
4,5	100	Ацетат
5	100	Ацетат
5,5	100	Ацетат
6	100	2-(N-морфолино)этан-сульфоновая кислота (MES)
6,5	100	Фосфат
7	100	Фосфат

Очищенный полипептид tFfXyn1 проявляет превосходную активность при pH от 4 до 6 с максимумом при pH 5 и в диапазоне температур от 50 до 65°C с максимумом около 58°C. Эти результаты представлены на фиг. 1A и B.

Пример 2. Сравнение воздействия различных полипептидов с ксиланазной активностью на солому с

нейтральной реакцией.

Проводили гидролиз нейтральной паровзрывной обработкой пшеничной соломы, используя для сравнения 100%-ную и 80%-ную (мас./мас.; определение белка по Брэдфорду, стандарт - BSA) фракции целлюлазы SCFMX0375 (Trichoderma reesei с повышенным уровнем β-глюкозидазы), при температуре 50°C и pH 5 в течение 24 ч.

Когда при этом 20% (мас./мас.; определение белка по Брэдфорду, стандарт - BSA) целлюлазы заменяли на полипептид tFfXyn1 (SEQ ID NO: 7), выход глюкозы и ксилозы возрастал, тогда как замена такого же количества целлюлазы на различные ксиланазы из Thermomyces lanuginosus (TlXyn1_GH11; SEQ ID NO: 8) и Trichoderma reesei (TrXyn2_GH11 SEQ ID NO: 10, TrXyn1_GH11 SEQ ID NO: 9, TrXyn4_GH30 SEQ ID NO: 11) не давало столь выраженного эффекта с точки зрения результата реакции гидролиза.

80% реакционной смеси дублировали и дополняли полипептидом tFfXyn1 в количестве 20% (мас./мас.; определение белка по Брэдфорду, стандарт - BSA). Проводили осахаривание в течение 24 ч при температуре 50°C и pH 5, после чего определяли степень превращения в сахара, измеряя количество сахаров с помощью ВЭЖХ. Как можно видеть, при добавлении tFfXyn1 высвобождение сахаров наибольшее. Полученные результаты представлены на фиг. 2.

Пример 3. Воздействие tFfXyn1 на пшеничную солому с нейтральной реакцией в присутствии белка GH61.

Проверяли синергическое действие tFfXyn1 (SEQ ID NO: 7) и TrEGIV_GH61 (T. reesei EGIV SEQ ID NO: 14), добавляя их к SCFMX0375 в различных соотношениях (количество белка определяли по Брэдфорду с BSA в качестве стандарта) очищенный tfFxyn1 и TrEGIV_GH61, которые вместе составляли 25% (мас./мас.; определение белка по Брэдфорду, стандарт - BSA). Было показано, что 8%-ное локальное максимальное содержание tFfXyn1 (мас./мас.; определение белка по Брэдфорду, стандарт - BSA) высвобождает наибольшее количество глюкозы из предварительно обработанной (нейтральная паровзрывная обработка) пшеничной соломы, когда использовали соотношение фермент:субстрат 0,5% (количество фермента определяли по Брэдфорду в расчете на сухую массу субстрата с BSA в качестве стандарта) и проводили осахаривание при температуре 50°C и pH 5 в течение 24 ч. Эти результаты представлены на фиг. 3.

Пример 4. Воздействие tFfXyn1 на солому с нейтральной реакцией в присутствии β-глюкозидазы (TeBg1_GH3; SEQ ID NO: 13) и эндоглюканазы (TrEGIV_GH61; SEQ ID NO: 14).

Определяли влияние повышенного уровня активности β-глюкозидазы TeBg1_GH3 (SEQ ID NO: 13) в присутствии tFfXyn1 и SCFMX375 на выход глюкозы и ксилозы при осахаривании обработанной нейтральной паровзрывной обработкой пшеничной соломы. Было обнаружено, что ферментативное высвобождение глюкозы из образцов указанного субстрата в присутствии tFfXyn1 и TrEGIV_GH61 еще более эффективно при повышеном уровне β-глюкозидазы. Осахаривание проводили при температуре 50°C и pH 5 в течение 24 ч. Полученные результаты показаны на фиг. 4.

Пример 5. Совместное действие tFfXyn1 и ксилозидазы.

Определяли влияние повышенного уровня активности ксилозидазы из Trichoderma reseei (TrXy1_GH3; SEQ ID NO: 12) в присутствии tFfXyn1 и SCFMX375 на выход глюкозы и ксилозы при осахаривании обработанной нейтральной паровзрывной обработкой пшеничной соломы. Осахаривание проводили при температуре 50°C и pH 5 в течение 24 ч. Полученные результаты представлены на фиг. 5.

Краткое описание фигур

Фиг. 1A демонстрирует стабильность очищенного tFfXyn1 в зависимости от pH;

фиг. 1B - стабильность очищенного tFfXyn1 в зависимости от температуры;

фиг. 2 - повышение выхода глюкозы и ксилозы в результате осахаривания обработанной нейтральной паровзрывной обработкой пшеничной соломы при сочетании целлюлозы SCFMX0375 и tFfXyn1 в сравнении с другими ксиланазами;

фиг. 3 - синергическое действие tFfXyn1 и белка GH61 в отношении высвобождения глюкозы из лигноцеллюлозного субстрата;

фиг. 4 - синергическое действие β-глюкозидазы TeBg1_GH3 и tFfXyn1 в отношении высвобождения мономерных сахаров из лигноцеллюлозного субстрата;

фиг. 5 демонстрирует, что выход ксилозы в присутствии tFfXyn1 значительно увеличивается при добавлении ксилозидазы.

Описание перечня последовательностей

SEQ ID NO: 1 - последовательность ДНК, соответствующая ксиланазе FfXyn1.

SEQ ID NO: 2 - аминокислотная последовательность ксиланазы FfXyn1 с сигнальным пептидом.

SEQ ID NO: 3 - последовательность ДНК, соответствующая ксиланазе mFfXyn1.

SEQ ID NO: 4 - аминокислотная последовательность зрелого белка (ксиланазы) mFfXyn1.

SEQ ID NO: 5 - искусственная последовательность ДНК, кодирующая зрелый белок (ксиланазу) tFfXyn1, слитый с сигнальным пептидом CBHI Trichoderma reesei и С-концевой меткой 6x-His-TAG.

SEQ ID NO: 6 - искусственная последовательность ДНК, кодирующая зрелый белок (ксиланазу) yFfXyn1, слитый с сигнальным пептидом Mf-α Saccharomyces cerevisiae и С-концевой меткой 6x-His-TAG.

SEQ ID NO: 7 - аминокислотная последовательность зрелого белка ксиланазы tFfXyn1, слитого с сигнальным пептидом CBHI Trichoderma reesei и С-концевой меткой 6x-His-TAG.

SEQ ID NO: 8 - аминокислотная последовательность зрелого белка ксиланазы TlXyn1_GH11 Thermomyces lanuginosus.

SEQ ID NO: 9 - аминокислотная последовательность зрелого белка ксиланазы 1 TrXyn1_GH11 Trichoderma reesei с 6xHis-TAG.

SEQ ID NO: 10 - аминокислотная последовательность зрелого белка ксиланазы 2 TrXyn2_GH11 Trichoderma reesei с 6xHis-TAG).

SEQ ID NO: 11 - аминокислотная последовательность зрелого белка ксиланазы 4 TrXyn4_GH30 Trichoderma reesei с 6xHis-TAG.

SEQ ID NO: 12 - аминокислотная последовательность зрелого белка ксилозидазы TrXy1_GH3 Trichoderma reesei с 6xHis-TAG.

SEQ ID NO: 13 - аминокислотная последовательность зрелого белка β-глюкозидазы TeBg1_GH3 Talaromyces emersonii с 6xHis-TAG.

SEQ ID NO: 14 - аминокислотная последовательность зрелого белка эндоглюканазы 4 TrEGIV_GH61 Trichoderma reesei с 6xHis-TAG.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид с ксиланазной активностью, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 2, и где указанный полипептид превращает по меньшей мере 60% (мас./мас.) ксилозосодержащих полисахаридов пшеничной соломы, которая была предварительно подвергнута нейтральной паровзрывной обработке, в ксилозу и/или ксилозосодержащие олигосахариды и глюкозу.

2. Полипептид по п.1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность указанного полипептида определена SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, где от 1 до 30 аминокислотных остатков заменены, отсутствуют или вставлены.

3. Полипептид по п.1 или 2, в котором глубина переработки лигноцеллюлозной биомассы в ксилозу и/или ксилозосодержащие олигосахариды и глюкозу составляет по меньшей мере 5:1 (мас./мас.) при воздействии указанного полипептида на указанную подвергнутую нейтральной паровзрывной обработке пшеничную солому при pH 5 и температуре 50°C за 24 ч.

4. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по п.1, причем указанная нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере с 85%-й идентичностью последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

5. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.4.

6. Клетка-хозяин, трансформированная вектором по п.5.

7. Клетка-хозяин по п.6, выбранная из Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces lactis, Pichia pastoris, Pichia angusta, Hansenula polymorpha, Aspergillus niger, Trichoderma reesei, Penicillium sp. и Myceliophthora thermophile.

8. Клетка-хозяин по п.6 или 7, отличающаяся тем, что способна к усиленной продукции одного или более полипептидов с активностями, выбираемыми из пиранозамонооксигеназной активности GH61, ксилозидазной активности, ксиланазной активности и β-глюкозидазной активности.

9. Способ получения полипептида с ксиланазной активностью по п.1, включающий стадии:

a) получение клетки-хозяина, трансформированной вектором, содержащим нуклеиновую кислоту по п.4;

b) культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, в которых продуцируется полипептид; и

c) выделение этого полипептида.

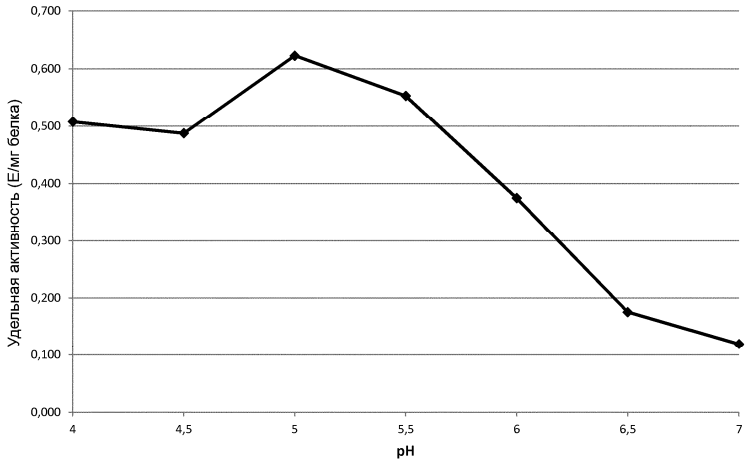
10. Способ по п.9, в котором клеткой-хозяином является дрожжевая клетка, и указанный полипептид имеет аминокислотную последовательность, определяемую SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, в которой от 1 до 30 аминокислотных остатков заменены, отсутствуют или вставлены.

11. Композиция для превращения ксилозосодержащих полисахаридов пшеничной соломы, которая была предварительно подвергнута нейтральной паровзрывной обработке, в ксилозу и/или ксилозосодержащие олигосахариды и глюкозу, содержащая полипептид по любому из пп.1-3.

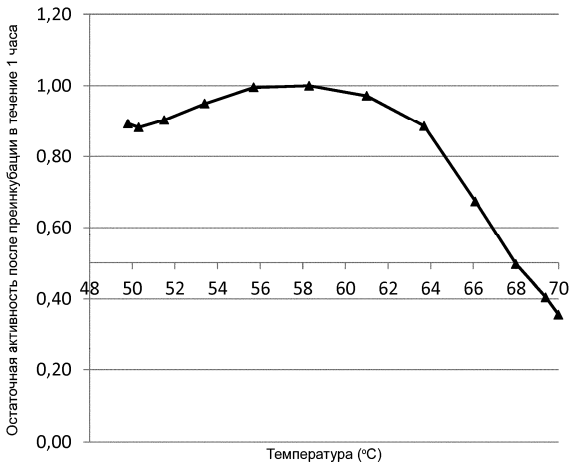
12. Композиция по п.11, дополнительно содержащая один или более полипептидов, выбираемых из целлюлаз, белка GH61, эндоксиланаз, ксилоглюканаз, ксилозидаз, ацетилксиланэстераз, эстераз феруловой кислоты, β-глюкозидаз, арабинофуранозидаз, галактаназ и арабиназ.

13. Применение полипептида по любому из пп.1-3 для ферментативной деградации лигноцеллюлозной биомассы.

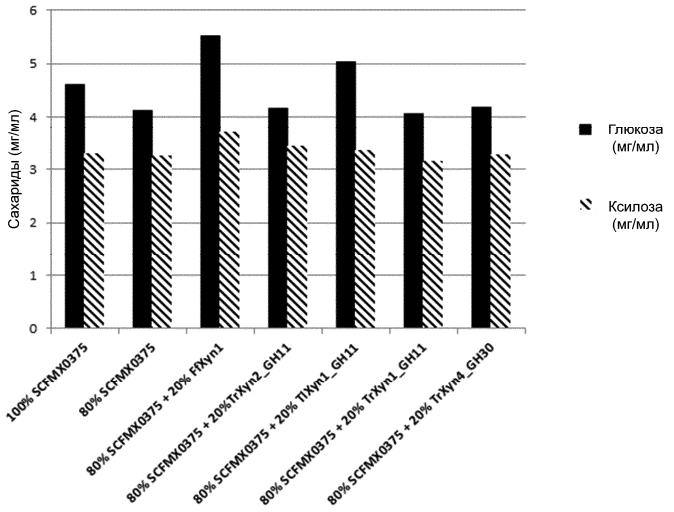
14. Применение композиции по п.12 или 13 для ферментативной деградации лигноцеллюлозной биомассы.



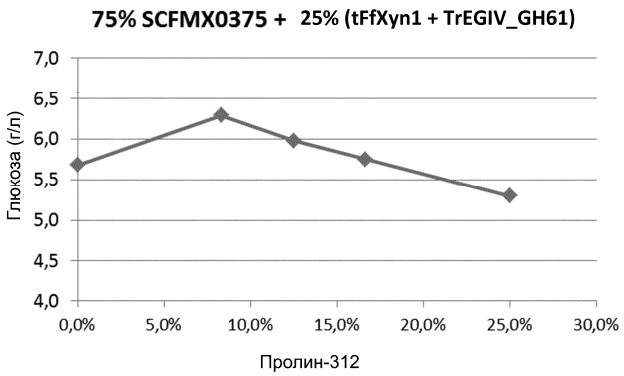
Фиг. 1А



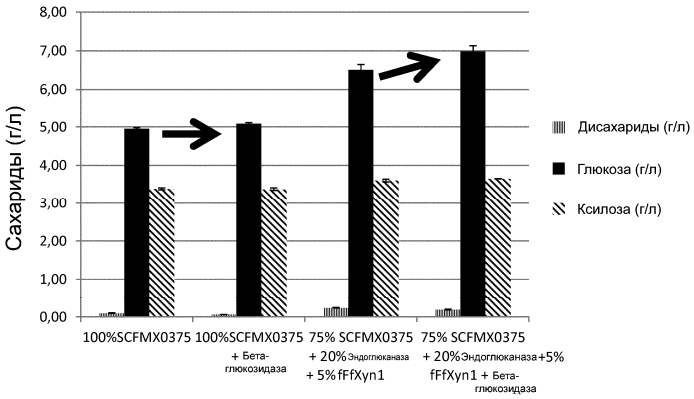
Фиг. 1В



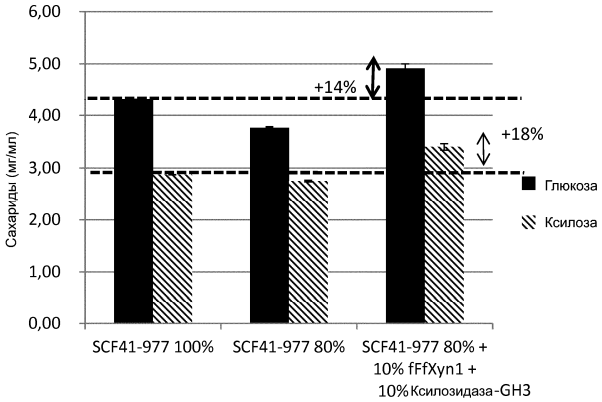
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5