

## КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТА МОДИФИЦИРОВАННОЙ КУТИНАЗЫ ИЗ *AUREBASIDIUM PULLULANS* НА ОСНОВЕ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ *KOMAGATAELLA PHAFFII*

Ермилов Ф. К.<sup>1</sup>

Научный руководитель – канд. хим. наук, эксперт лаборатории биотехнологий  
Сизова И. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, Гатчина, Россия  
ermilov\_fk@pnpi.nrcki.ru

### Введение

Кутиназы (К.Ф. 3.1.1.74) представляют собой ферменты малой молекулярной массы (20-25 кДа), относящиеся к семейству  $\alpha/\beta$ -гидролаз и катализирующие гидролиз сложноэфирных связей в природных и синтетических полиэфирах. В отличие от липаз и эстераз, также относящихся к  $\alpha/\beta$ -гидролазам, кутиназы проявляют более широкий спектр каталитической активности, что во многом обеспечивается отсутствием гидрофобного домена вблизи активного центра, отвечающего за эффект интерфейсной активации [1]. В связи с этим кутиназы применяются в различных сферах: текстильной промышленности, производстве стиральных порошков, переработке биомассы, пищевых продуктов и детоксикации загрязнителей окружающей среды. В настоящее время, на смену традиционным пластикам приходят различные аналоги, такие как поликапролактон (ПКЛ), полибутиленсукцинат и другие, темпы производства которых увеличиваются с каждым годом [4]. В свою очередь наличие продуцента эффективной кутиназы позволит решить потенциальную проблему экологичной утилизации отходов новых синтетических полиэфиров.

Метилотрофные дрожжи *Komagataella phaffi* GS115 являются эффективной микробной платформой для конструирования рекомбинантного продуцента кутиназы благодаря наличию высокопродуктивного индуцибельного промотора AOX1, механизмов секреции гетерологичных белков в культуральную жидкость (КЖ) и возможностью отбора положительных трансформантов без использования генов устойчивости к антибиотикам с целью повышения экологической безопасности при промышленном применении [3].

В данной работе показано увеличение продуктивности штамма-продуцента с помощью двух основных подходов: (1) увеличение количества рекомбинантного белка в КЖ за счет увеличения копий гена кутиназы, интегрированных в хромосому и (2) увеличение удельной активности рекомбинантного продукта с помощью внесения аминокислотных замен.

### Основная часть

В ходе работы был проведён скрининг мицелиальных грибов из коллекции ПИЯФ, в результате которого идентифицирован штамм *Aureobasidium pullulans* ВКМ 1116, способный к деградации ПКЛ. На основе данных аннотированной геномной базы MucCosm и секвенирования был выявлен ген *ApCUT1* (NCBI: XWX49245.1), кодирующий белок с высокой степенью идентичности с кутиназой *A. pullulans* variant *namibiae* (NCBI: XP\_013423757.1; 96%) и высокоактивной кутиназой CLE1 из *Cryptococcus* sp. S-2 (NCBI: Q874E9; 65%). Выравнивание белковых последовательностей *ApCUT1* и CLE1 позволило определить аминокислотные замены, которые, согласно литературным данным [2], могут повышать гидролитическую активность фермента по отношению к полимерным субстратам.

Гены дикого типа и мутантных форм *ApCUT1* были экспрессированы в клетках дрожжей *K. phaffii* с использованием интеграционных векторов, содержащих маркер устойчивости к зеоцину. Отбор многокопийных трансформантов проводился с использованием высоких концентраций антибиотика (1000 мкг/мл) благодаря наличию прямой зависимости между уровнем устойчивости к антибиотику и количеством копий гена, интегрированных в хромосому *K. phaffii*. В результате были получены продуценты рекомбинантных кутиназ дикого и мутантных типов. Их биохимические свойства были охарактеризованы с применением модельного субстрата 4-нитрофенил (16-метилсульфоновый эфир) гексадеcanoата (pNMSEH) и ПКЛ. Показано, что одна из аминокислотных замен (Y58W) существенно увеличивает накопление целевого белка в культуральной жидкости и повышает каталитическую активность в отношении ПКЛ.

Кодирующая последовательность кутиназы, содержащая аминокислотную замену Y58W, была в дальнейшем использована для конструирования экспрессионных кассет на основе плазмиды pPIC9 с целью отбора трансформантов с использованием маркера прототрофности по гистидину HIS4. Из-за отсутствия зависимости между количеством копий гена HIS4, интегрированных в хромосому и концентрацией гистидина в агаризованной среде, был разработан метод на основе скорости гидролиза флуоресцеин-дибутирата и интенсивности флуоресценции для отбора многокопийных трансформантов в формате 96-луночных планшетов. В результате данная система позволила получить безмаркерные штаммы с более высоким уровнем продукции белка (100 мг/л) по сравнению с зеоцин-резистентными клонами (60 мг/л).

### Выводы

В результате работы были проанализированы различные аминокислотные замены для повышения каталитической активности кутиназы из *Aureobasidium pullulans*. Показано, что аминокислотная замена (Y58W) существенно повышает каталитическую активность в отношении ПКЛ и выход целевого белка.

Также были получены многокопийные штаммы-продуценты кутиназы с аминокислотной заменой Y58W с использованием различных интеграционных векторов, содержащих маркеры устойчивости к зеоцину или маркеры прототрофности к гистидину.

Полученные продуценты кутиназы могут быть использованы для эффективного каталитического гидролиза отходов ПКЛ, что открывает возможности эффективной утилизации пластиковых отходов.

### Литература

1. Chen S., Su L., Chen J., Wu J. Cutinase: Characteristics, preparation, and application // *Biotechnology Advances*. 2013. Vol. 31, no. 8. P. 1754-1767. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.005>
2. Kodama Y., Masaki K., Kondo H. et al. Crystal structure and enhanced activity of a cutinase-like enzyme from *Cryptococcus* sp. strain S-2 // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2009. Vol. 77, no. 3. P. 710-717. <https://doi.org/10.1002/prot.22484>
3. Sevillano L., Development of an antibiotic marker-free platform for heterologous protein production in *Streptomyces* / L. Sevillano, M. Díaz, R. I. Santamaría // *Microbial Cell Factories*. 2017. Vol. 16, no. 1. P. 164. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0781-y>
4. Verma S. K., Prasad A., Katiyar V. State of art review on sustainable biodegradable polymers with a market overview for sustainability packaging // *Materials Today Sustainability*. 2024. Vol. 26, P. 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.mtsust.2024.100776>