

УДК 577.151.52

КЛОНИРОВАНИЕ И ГОМОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *BGL1*, КОДИРУЮЩЕГО В-ГЛЮКОЗИДАЗУ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*, ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВОГО ФЕРМЕНТА

П.В. Волков, А.М. Рожкова, А.П. Сеницын

ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха

Штамм микроскопического гриба *Penicillium verruculosum* на протяжении последнего десятилетия используется для получения и изучения комплексных ферментных препаратов (ФП) [1], основой которых является собственный целлюлолитический комплекс ферментов, включающий высокоактивные целлобиогидролазы (КФ 3.2.1.91), эндо- β -1,4 – глюканазу (КФ 3.2.1.4, GH5) и β -глюкозидазу (КФ. 3.2.1.21, БГЛ). Биохимические свойства первых двух целлюлаз к настоящему времени изучены и описаны в работе [2], а исследование физико-биохимических свойств, ранее не изученной, грибной БГЛ *P. verruculosum* представляет собой весьма актуальную фундаментальную задачу, поскольку БГЛ является не только ключевым ферментом любого целлюлазного комплекса, но и потенциальным биокатализатором с новыми свойствами.

На первом этапе исследования ген *bgl1*, состоящий из 2443 п.о., был амплифицирован с помощью ПЦР и методом независимого лигирования клонирован в вектор pXEG под контролем сильного промотора гена *xyIA*, кодирующего ксиланазу А гриба *P.canescens*. Полученной конструкцией pXylA-BGLB1 были трансформированы протопласты штамма – реципиента RN3–11–7 гриба *P.canescens*. В результате первичной селекции был отобран рекомбинантный штамм *P.canescens* PC1, значение целевой активности БГЛ по синтетическому субстрату ПНФГ и целлобиозе в культуральной жидкости (КЖ) которого составило 150 и 270 ед./мл, что превосходило значения подобных активностей в КЖ штамма-реципиента *P.canescens* в 300 раз. На основе КЖ *P.canescens* PC1 был получен лиофильно высушенный ферментный препарат (ФП).

На втором этапе исследования из ФП PC1 методами хроматографии (анионообменная хроматография – Source 15Q → гидрофобная хроматография – Source 15ISO → гель-фильтрация Superdex 75) был получен очищенный рекомбинантный фермент БГЛ *P.verruculosum* с массой 90 кДа и pI 3,75. Установлено, что фермент проявляет максимальную активность в кислой области pH (4,6) и при температуре 65°С. Период полуинактивации при 60°С составляет 87 мин. Для рекомбинантной БГЛ был определен конкурентный тип ингибирования глюкозой со значением K_i , составившим 0,2 мМ. Полученные данные позволяют сделать вывод о довольно сильном ингибировании фермента в сравнении с другими изученными грибными БГЛ [3], что негативно сказывается на процессе ферментативного гидролиза микрокристаллической целлюлозы и других целлюлозосодержащих субстратах. Поэтому дальнейшие исследования будут направлены на делецию гена *bgl* *P.verruculosum* в хромосоме гриба и клонировании высокоспецифичной БГЛ с минимальной степенью ингибирования.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (номер гранта 18–29–07070)

ЛИТЕРАТУРА

1. Сеницын А.П., Осипов Д.О., Рожкова А.М., Бушина Е.В., Доценко Г.С., Сеницына О.А., Кондратьева Е.Г., Немашкалов В.А., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Окунев О.Н. Получение высокоэффективных ферментных комплексов целлюлаз и гемицеллюлаз для гидролиза растительного сырья на основе штамма *Penicillium verruculosum* // Биотехнология. – 2013. – № 5. – С. 50–53.
2. Волков П.В., Рожкова А.М., Правильников А.Г., Андрианов Р.М., Доценко Г.С., Беккаревич А.О., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Зоров И.Н., Сеницын А.П. Получение ферментных препаратов на основе рекомбинантных штаммов *Penicillium canescens* с высокой способностью к гидролизу растительного сырья // Прикладная биохимия и биотехнология. – 2012. – № 1, С. 66–74.
3. Короткова О.Г., Семенова М.В., Морозова В.В., Зоров И.Н., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Сеницын А.П. Выделение и свойства грибных бета-глюкозидаз // Биохимия. – 2009. – № 5, С. 699–709