

Получение химерной конструкции: эндоглюканазы II, содержащей целлюлозосвязывающий домен, в штамме *Penicillium canescens*

Научный руководитель – Рожкова Александра Михайловна

Бибиков Никита Михайлович

Студент (магистр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра микологии и альгологии, Москва, Россия

E-mail: bibik0808@mail.ru

Целлюлозосвязывающий домен (ЦСД, cellulose-binding domain, CBD) является функциональным доменом многих целлюлолитических ферментов и обеспечивает адсорбцию целлюлаз на нерастворимом полимерном субстрате. Его роль заключается в связывании плотно уложенных волокон целлюлозы, ослаблении водородных связей между волокнами и повышении сродства фермента к субстрату [1].

В некоторых ферментах целлюлозосвязывающий домен отсутствует. В частности, 1,4-бета-глюканаза, или эндоглюканаза II (ЭГИ) не имеет ЦСД-домена. Функция ЭГИ заключается в статистическом гидролизе 1,4-бета-связей в аморфных участках целлюлозы с образованием олигосахаридов [2]. Присоединяя ЦСД к эндоглюканазе II, следует ожидать локальное увеличение концентрации фермента в гетерогенной системе фермент-субстрат и, как следствие, увеличение эффективности катализа.

Таким образом, целью работы являлось создание химерной конструкции: эндоглюканазы II, содержащей ЦСД, для улучшения каталитической функции эндоглюканазы II.

В ходе работы была создана химерная генетическая конструкция *eglII-cbhI^{cbd}*, содержащая ген *eglII*, кодирующий ЭГ II, и ген *cbhI^{cbd}*, кодирующий ЦСД, относящийся к целлюлозоброуазу I, ферменту, имеющему максимальную адсорбцию на микрокристаллической целлюлозе. Оба гена были амплифицированы с использованием генетического материала гриба *Penicillium verruculosum*, секретирующего белки гидролитического комплекса. Химерная конструкция *eglII-cbhI^{cbd}* была включена в лабораторный вектор pXEG, клонирована в клетках *Escherichia coli* МАСН1 и трансформирована в клетки реципиентного гриба *Penicillium canescens* RN 3-11-7. Рекомбинантные клоны были ферментированы в жидкой среде, после чего культуральная жидкость (КЖ) была проанализирована на наличие продукта, содержание химерного белка ЭГИ-ЦСД и его активность.

Был проведен электрофорез образцов КЖ в денатурирующих условиях. Показано, что молекулярная масса химерного белка ЭГИ-ЦСД составляет 50 кДа, что соответствует сумме молекулярных масс ЭГИ и ЦСД. Также была определена удельная активность ЭГИ-ЦСД по растворимому субстрату, натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы, которая оказалась в 3 раза выше, чем активность нативной ЭГИ.

Источники и литература

- 1) Ito J., Fujita Y., Ueda M., Fukuda H., Kondo A. Improvement of cellulose-degrading ability of a yeast strain displaying *Trichoderma reesei* endoglucanase II by recombination of cellulose-binding domains // *Biotechnology progress*. 2004. V. 20. № 3. P. 688-691.
- 2) Linder M., Teeri T.T. The roles and function of cellulose-binding domains // *Journal of biotechnology*. 1997. V. 57. № 1-3. P. 15-28.