

## РАЗРАБОТКА МУТАНТНОЙ БЕТА-ГЛЮКОЗИДАЗЫ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ПОЛУЧЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ

Климова А. Д.<sup>1</sup>, Пугачева А. С.<sup>1</sup>

Научный руководитель – канд. биол. наук, доцент Коляденко И. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>АГТУ «ВШН»

<sup>2</sup>Университет ИТМО

aclimova04@mail.ru

### Введение

Бета-глюкозидаза (ЕС 3.2.1.21) является ключевым ферментом целлюлазного комплекса, ускоряет гидролиз целлобиозы до глюкозы и снимает ингибирующее действие целлобиозы на другие ферменты. Для технологий переработки целлюлозосодержащего сырья важна высокая каталитическая активность, термостабильность и толерантность фермента к глюкозе, поскольку при высоких концентрациях продукта происходит снижение эффективности гидролиза. По литературным источникам, природные бета-глюкозидазы грибов рода *Aspergillus* характеризуются низкой скоростью гидролиза целлобиозы и требуют либо увеличения дозы фермента в конечном ферментативном препарате, либо улучшения его свойств. Современные подходы генной инженерии позволяют получать мутантные варианты фермента с улучшенными характеристиками для промышленного применения.

Целью данной работы стало изучение и модификация бета-глюкозидазы из *Aspergillus niger 1064* для повышения её эффективности и устойчивости к глюкозе при гидролизе целлюлозосодержащего сырья.

### Основная часть

В качестве исходного фермента рассматривалась бета-глюкозидаза грибов рода *Aspergillus*, ранее показавшая высокую активность в составе целлюлазных коктейлей для гидролиза целлюлозы [1,3]. На основе анализа литературных данных были отобраны аминокислотные замены, потенциально влияющие на связывание субстрата и фермента. С применением методов направленного мутагенеза планируется получение серии мутантных вариантов фермента, которые будут обладать более высокой активностью, стабильностью и толерантностью к глюкозе.

Рекомбинантная экспрессия гена бета-глюкозидазы предполагается в системе *Pichia pastoris*, которая показывает себя как эффективная промежуточная платформа для получения грибных ферментов с высоким выходом и правильной посттрансляционной модификацией для получения широкого спектра ферментов с внесёнными мутациями. Биохимическая характеристика вариантов фермента будет включать определение кинетических параметров по модельным субстратам, оценку температурного и pH-оптимумов, термостабильности. Наиболее удачные варианты планируется проверить на целлюлозосодержащем сырье, а также дополнить коммерческие ферментативные коктейли для получения сахаров из целлюлозы, с целью оценки эффекта замен на общую эффективность процесса.

На основе литературных данных были выбраны аминокислотные замены, направленные на увеличение активности, глюкозотолерантности и стабильности фермента. Все мутации вносятся методом QuickChange в плазмиду *pPinkaHC+BglA* с селективным маркером накопления предшественников аденина. Линеаризованные плазмиды трансформируют в *Pichia pastoris* методом электропорации с отбором белых колоний по фенотипическому признаку.

### **Выводы**

На данный момент получено 9 конструкций с целевыми аминокислотными заменами, потенциально увеличивающими активность и глюкозотолерантность фермента. Три конструкции успешно трансформированы в *Pichia pastoris*. Дальнейшая работа будет направлена на изучение физико-химических свойств полученных трансформантов и интеграцию других конструкций. Ожидается, что создание мутантных форм бета-глюкозидазы с повышенной глюкозотолерантностью, термостабильностью и активностью позволит снизить дозировку фермента и повысить степень конверсии целлюлозы в глюкозу при переработке макулатуры. Интеграция фермента в состав коммерческих ферментативных коктейлей для гидролиза целлюлозосодержащего сырья потенциально обеспечит рост выхода сахаров и увеличение экономических показателей процессов производства.

### **Литература**

1. Singhanian R.R., Patel A.K., Sukumaran R.K. et al. Fungal beta-glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials // *Bioresource Technology*. 2013. Vol. 147. P. 588-597.
2. Осмоловский А.А., Сеницын А.П., Розанов А.С. и др. Биоконверсия целлюлозосодержащего сырья: ферментативный гидролиз целлюлозы // *Пищевая промышленность*. 2022. № 11. С. 32-42.
3. Yaoi K., Nakanishi K., Konda Y. et al. Directed evolution of a fungal  $\beta$ -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* for efficient biomass conversion // *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2016. Vol. 43, № 4. P. 513–521. DOI: 10.1007/s10295-016-1735-2.