**Клонирование и изучение свойств новой протеазы из *Penicillium verruculosum***

***Шаплин А.А.1, Синельников И.Г.2, Зоров И.В.1,2***

*Студент, 6 курс специалитета*

*1Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,*

*химический факультет, Москва, Россия*

*2Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия*

*E-mail:* [*exe.andrey0081@mail.ru*](mailto:exe.andrey0081@mail.ru)

Цель данной работы состояла в поиске и определении собственных протеолитических ферментов *Penicillium verruculosum* и в конструировании штамма-продуцента гомологичной протеазы - аналога аспергилопепсина.

В работе был осуществлен анализ данных полногеномного секвенирования промышленного штамма-продуцента *Penicillium verruculosum* B1-537*.* Последовательности генов анализировали относительно базы данных Pfam для поиска генов протеаз. Как показали результаты секвенирования генома*,* штамм имеет в своем арсенале большое разнообразие протеолитических ферментов, в том числе 23 гена, кодирующих щелочные, кислые и нейтральные протеазы. Для дальнейшей работы была определена кислая протеаза (*Pep*), имеющая гомологию с промышленно значимым ферментом – аспергилопепсином (76 %). Ее внеклеточная природа была подтверждена при помощи анализа сигнального пептида инструментами SignalP v5.0.

Для определения функциональных и биохимических свойств исследуемой протеазы была клонирована полная кодирующая последовательность фермента из генома *P. verruculosum,* размергена *pep* совпадал с предсказанным и составил 1329 п.н.Далее была сконструирована плазмида, в которой кодирующую последовательность протеазы помещали под контроль сильного индуцибельного промотора нативной целлобиогидролазы I [1]. Такой плазмидой трансформировали штамм-реципиент *P. verruculosum.*

Полученные трансформанты представляли собой суперпродуценты гомологичной протеазы *Pep*. Далее осуществляли культивирование трансформантов на жидкой среде в условиях индукции синтеза *Pep*. Состав культуральной жидкостианализировали методом гель-электрофореза в денатурирующих условияхипутем измерения протеолитической активности методом Ансона [2]. Активность протеазы оценивали по ее способности разлагать белковый субстрат гемоглобин с применением спектрофотометрического определения продуктов протеолитической реакции – пептидов и аминокислот. У исследуемой протеазы были измерены Kм, Vmax и определены оптимумы действия – температурный (активности оценивалась в диапазоне 35-80 оС) и pH (фермент предварительно инкубировался в буфере с диапазоном pH 2 - 8). Последний, в частности, подтвердил гипотезу о кислой природе этой протеазы, будучи равным 2.5.

*В работе использовано оборудование ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН (ИНБИ РАН)).*

**Литература**

1. Ilmén M., Saloheimo A., Onnela M.L., Penttilä M.E. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus Trichoderma reesei // Appl Environ Microbiol. 1997. Vol. 63. No. 4. P. 1298–306.

2. Anson M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin // Journal of General Physiology. 1938. Vol. 22. No. 1. P. 79–89.