

**Применение сайт-направленного мутагенеза с целью улучшения физико-химических свойств эндоглюканазы 2 мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*.**

**Научный руководитель – Габдулхаков Азат Габдрахманович**

***Вахрушева Анна Владимировна***

*Студент (магистр)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: vakhrusheva.ann@yandex.ru*

В настоящее время использование ферментных препаратов в качестве кормовой добавки является ключевым условием эффективного животноводства [1], главным образом, свиней и птицы. Основой комбикормов для сельскохозяйственных животных являются злаковые культуры, такие как овёс, рожь, пшеница, ячмень и другие, клеточная стенка которых содержит в своём составе труднорасщепляемые некрахмальные полисахариды (НПС) [2]. НПС обладают, так называемыми, антипитательными свойствами, что приводит к уменьшению скорости прохождения корма по пищеварительному тракту, снижению его переваримости и эффективности всасывания питательных веществ. Добавление ферментных препаратов в корма сельскохозяйственных животных позволит снизить вязкость кормов и повысить их усвояемость, как следствие, ускорится рост молодняка и улучшится физиологическое состояние животных [3].

Ключевыми ферментами, используемыми в качестве кормовой добавки для расщепления растворимых НПС, являются  $\beta$ -глюканазы, в число которых входят эндо-1,4- $\beta$ -глюканазы (ЭГ2). Таким образом, целью данной работы является улучшение физико-химических свойств эндоглюканазы 2 промышленного грибного продуцента ферментов *Penicillium verruculosum*.

Структуры ЭГ2 и его комплекса с целлобиозой были решены методом рентгеноструктурного анализа. Сначала данный фермент был выделен из *P. verruculosum* и закристаллизован методом диффузии паров в висючей капле. Структуры были определены методом молекулярного замещения, разрешение составило 2.1 Å для изолированного фермента и 1.8 Å для комплекса ЭГ2 с целлобиозой. Полученные модели удовлетворяют всем стереохимическим и рентгеноструктурным критериям. Координаты моделей депонированы в банк белковых структур (PDB ID 5I6S и PDB ID 5L9C).

На основании полученной структуры были спланированы точечные аминокислотные замены, направленные на снижение ингибирования работы фермента продуктом реакции. Методом ПЦР с использованием геномной ДНК *P. verruculosum* в качестве матрицы был амплифицирован ген целевого фермента ЭГ2, содержащий необходимые мутации. Эти фрагменты далее были клонированы в шаттл-вектор, разработанный в ФИЦ Биотехнологий РАН ранее. Далее полученные плазмиды были трансформированы в компетентные клетки *E. coli* для наработки ДНК.

На следующем этапе была проведена трансформация лабораторного штамма-реципиента *P. canescens*, что позволило получить рекомбинантные штаммы, продуценты мутантных форм ЭГ2. Мутантные формы фермента были выделены и проанализированы их физико-химические свойства.

Выводы:

1) Решена структура эндоглюканазы 2 из *P. verruculosum* в изолированном состоянии (PDB ID 5I6S) и в комплексе с целлобиозой (PDB ID 5L9C) методом рентгеноструктурного анализа;

2) С помощью сайт-направленного мутагенеза на основе гриба *P. canescens* получены рекомбинантные штаммы-продуценты мутантных форм эндоглюканазы 2;

3) Проведено культивирование новых продуцентов в ферментёрах с рабочим объёмом 1 л с целью наработки ферментных препаратов, содержащих мутантные формы эндоглюканазы 2;

4) Методом хроматографии выделены гомогенные мутантные формы эндоглюканазы 2 и исследованы их физико-химические свойства.

### Источники и литература

- 1) Ravindran V. Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities // J. Appl. Poult. Res. 2013. V. 22. № 3. P. 628.
- 2) Осипов Д.О., Рожкова А.М., Матыс В.Ю. и др. Получение биокатализаторов на основе рекомбинантных штаммов-продуцентов гетерологичной ксиланазы в грибе *Penicillium verruculosum*. Применение их в гидролизе отходов лесной и деревообрабатывающей промышленности // Катализ в промышленности. — 2010. — № 5. — С. 64.
- 3) Яровенко В.Л., Калунянц К.А., Голгер Л.И. Производство ферментных препаратов из грибов и бактерий // Пищевая промышленность. — 1969. — С. 26.