

УДК 601.4

ПОЛУЧЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ МУТАНТНЫХ ФОРМ КСИЛАНАЗЫ E PENICILLIUM CANESCENS И ФИТАЗЫ ASPERGILLUS NIGER**Ю.А. Денисенко, А.С. Доценко, О.Г. Короткова, А.М. Рожкова, А.П. Синицын***ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН», Москва, Россия*

Рационы нежвачных животных состоят в основном из кормовых ингредиентов растительного происхождения, которые представляют собой смесь белков, жиров и углеводов. В ингредиентах корма могут присутствовать различные антипитательные факторы, такие как фитаты, некрахмальные полисахариды и ингибиторы протеаз [1]. Антипитательные факторы ограничивают питательные вещества, которые могут быть использованы животными, получающими рацион на основе растительного сырья. К тому же, растущее экономическое давление, которое в настоящее время ложится на животноводов, требует более эффективного использования низкосортных кормов. Одним из подходов к решению этой проблемы является добавление в рацион животных гидролитических ферментов в попытке помочь перевариванию и усвоению труднодоступных питательных веществ и удалить из рациона антипитательные факторы. Добавление ферментов в корма для сельскохозяйственных животных и птицы широко используется в современном мире из-за увеличения питательной ценности пищевых продуктов [2]. Таким образом, обычно кормовые ферменты группируют как карбогидразы (гидролизующие олиго- и полисахариды), протеазы (расщепляющие белки) и фитазы (лизирующие фитаты) в зависимости от молекул-мишеней, на которые они воздействуют. Добавление ферментов в корм может по-разному влиять на разных животных, влияя на скорость усвоения питательных веществ и эффективность работы пищеварительной системы [3]. Опасения, связанные с этой практикой, заключаются в возможности используемых ферментов выдерживать и не терять каталитическую активность в ходе процесса температурной обработки кормов [4].

Фосфор является важным элементом для обеспечения жизнедеятельности организмов. Преобладающая доля фосфора в кормах для животных содержится в виде фитатов – солей фитиновой кислоты. Фитаты не гидролизуются в кишечнике моногастричных животных, что приводит к необходимости вводить дополнительные дорогостоящие источники фосфора. Включения в корма для сельскохозяйственных животных фитазы позволяет значительно повысить биодоступность фосфора, которые содержится в кормах на основе растительного сырья. Также соли фитиновой кислоты способны связывать минералы и аминокислоты, которые становятся недоступными для животного. Это приводит к тому, что полезные питательные вещества не усваиваются животным, и вместо этого выделяются в окружающую среду. Исследования применения фитаз продемонстрировали увеличение доступности фосфора в рационе домашней птицы, что привело к улучшению показателей роста и улучшению пищеварения [5].

Класс ферментов карбогидраз включает ксиланазы, глюканазы, амилазы и др. Они действуют в желудке животных, расщепляя природные полисахариды, такие как клетчатка, крахмал и некрахмальные полисахариды до олигосахаридов и простых сахаров.

Основной функцией ксиланаз и глюканаз является деградация некрахмальных полисахаридов с целью снижения вязкости корма, который находится в желудочно-кишечном тракте, и в увеличении эффективности усваиваемости питательных веществ. Другим положительным эффектом является улучшение состояния микрофлоры животных. Одним из наиболее распространенных полисахаридов является ксилан. Ксиланаза способна гидролизовать арабиноксиланы и глюкурнооксиланы злаковых растений, значительно снижая вязкость растворов и позволяя животным поглощать ее компоненты в качестве источника энергии. Это снижает потребность в дополнительных питательных компонентах в конечном рационе [6].

Целью данной работы было получение методами генной инженерии мутантных ксиланазы *E Penicillium canescens* и фитазы *Aspergillus niger* с повышенной термостабильностью.

Последовательность действий для каждого фермента была идентична и включала в себя следующие этапы: выбор одинарных аминокислотных замен, получение генов, кодирующих мутантные формы ферментов, методом сайт-направленного мутагенеза в составе плазмиды pUC-SBHI, проведение трансформации в компетентные клетки *E. coli* с целью наработки плазмидной ДНК, проведение трансформации в штамм-реципиент *P. vermiculatum*, культивирование и отбор клонов, экспрессирующих мутантные формы ферментов, выделение ферментов в гомогенном виде методами жидкостной хроматографии и изучение свойств мутантных форм фермента.

Для проведения сайт-направленного мутагенеза были сконструированы специфические праймеры. После проведения сайт-направленного мутагенеза и наработки плазмидной ДНК было произведено секвенирование ДНК для подтверждения наличия необходимой кодоновой мутации. Экспрессия целевых ферментов в штамме-реципиенте подтверждалось с помощью ПААГ-электрофореза и MALDI-TOF масс-спектрометрии. Культуральные жидкости, полученные после культивирования штаммов *P. verruculosum* в колбах, были использованы для выделения и очитки форм ксиланазы Е и фитазы. Фракционирование осуществляли с помощью анионообменной хроматографии на колонке с носителем Source 15Q. В качестве элюентов использовали 10 mM Bis-tris/HCl и 10 mM Bis-tris/HCl, 1M NaCl, pH 6,0, фракционирование осуществляли в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 0,4 М. Для гомогенных форм ферментов были определены следующие параметры: каталитическая активность по отношению к глюконооксиану и фитату натрия для ксиланаз и фитаз соответственно, периоды температурной полуинактивации при 70 и 60 °С для ксиланаз и фитаз соответственно, температура плавления методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии.

Для ксиланазы Е была получена термостабильная мутантная форма S104M. Стерически аминокислотная замена находится в области контакта α -спирали и петли в высокоподвижном регионе начала аминокислотной последовательности; при этом замена бокового радикала серина на аналогичный по свойствам и большего размера радикал метионина обеспечивает уплотнение укладки аминокислотной цепи.

Изучение температурной инактивации при 70 °С гомогенных форм ксиланаз Е позволило определить периоды полуинактивации, которые составили 3,8 и 6,6 минут для нативной рекомбинантной формы и формы с заменой S104M соответственно. Период полуинактивации для мутантной формы вырос в 1,74 раза. Каталитическая активность по отношению к глюконооксиану составила 75 и 82 ед./мг для нативной и мутантной формы соответственно. Температура плавления для ксиланазы Е с аминокислотной заменой S104M увеличилась на 3,1 °С по сравнению температурой плавления нативной формы (рисунок 1, таблица 1).

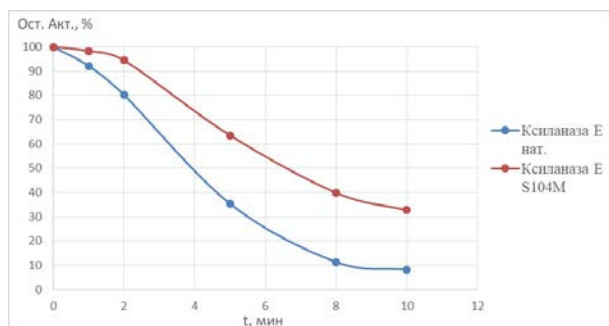


Рисунок 1. Остаточная активность нативной и мутантной форм ксиланаз Е *P. canescens* в процессе термоинактивации при 70 °С

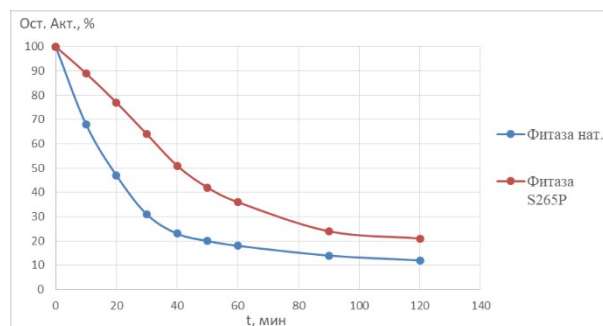


Рисунок 2. Остаточная активность нативной и мутантной форм фитазы *A. niger* в процессе термоинактивации при 60 °С

Для фитазы была получена мутантная форма S265P, которая обладала увеличенной термостабильностью. Предполагается, что замена серина на пролин приводит к заполнению внутриспиральной полости и к увеличению числа внутримолекулярных связей.

Изучение температурной инактивации при 60 °С гомогенных форм фитазы позволило определить периоды полуинактивации, которые составили 26 и 41 минуту для нативной рекомбинантной и мутантной формы S265P соответственно. Период полуинактивации для мутантной формы вырос в 1,58 раз. Каталитическая активность по отношению к фитату натрия составила 61 и 72 ед./мг для нативной и мутантной формы соответственно. Температура плавления для фитазы с аминокислотной заменой S265P увеличилась на 2,0 °С по сравнению температурой плавления нативной формы (рисунок 2, таблица 1).

Таблица 1. Параметры рекомбинантных нативных и мутантных форм ферментов.

Форма фермента	Акт., ед./мг	t 1/2, min	T пл., °C
Ксиланаза Е нат.	75 ± 4	3,8±0,4 (70°C)	70,0 ± 0,1
Ксиланаза Е S104M	82 ± 4	6,6±0,6 (70°C)	73,1 ± 0,1
Фитаза нат.	61 ± 3	26 ± 2 (60°C)	60,7 ± 0,1
Фитаза S265P	72 ± 4	41 ± 4 (60°C)	62,7 ± 0,1

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в соответствии с договором № 075–15–2022–318 от 20.04.2022 о предоставлении гранта в виде субсидии из федерального бюджета РФ. Грант предоставлен для государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Литература

- Exogenous enzymes in monogastric nutrition – their current value and future benefits. Bedford M.R. Animal Feed Science and Technology Volume 86, Issues 1–2, 31 July 2000, Pages 1–13.
- Enzymes in the Animal Feed Industry. B.K. Ojha. Chapter 7. Enzymes in Food Biotechnology Production, Applications, and Future Prospects, 2019, Pages 93–109.
- The evolution and application of enzymes in the animal feed industry: the role of data interpretation. Michael R. Bedford. British Poultry Science Volume 59, 2018 – Issue 5, Pages 486–493.
- Microbial Enzymes and Their Applications in Food Industry: A Mini-Review. Michael O. Okpara. Advances in Enzyme Research Volume 10 No.1, March 2022.
- Significance of phytic acid and supplemental phytase in chicken nutrition: a review. Singh P World's Poult Sci J 64:553–580, 2008.
- The use of NSP enzymes in poultry nutrition: myths and realities. U. Aftab and M.R. Bedford. Cambridge University Press: 19 March 2018.

УДК 66.047

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ЭТАП РАЗРАБОТКИ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ БОЛЕЗНИ МАРЕКА

Е.И. Ярыгина, А.А. Олешкевич, В.Ю. Лага

ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

Болезнь Марека (БМ) – лимфопролиферативное заболевание кур, является серьезной проблемой для птицеводства. Возбудитель – онкогенный ДНК-содержащий альфагерпесвирус – обладает способностью сохраняться и в хозяине, и в экосистеме. При этом вирус эволюционирует, что приводит к появлению более вирулентных популяций патотипов вируса болезни Марека (ВБМ). Кроме вирулентных штаммов ВБМ первого серотипа, в природе существуют два неонкогенных: второй серотип – вирус герпеса кур (ВГК) и третий серотип – вирус герпеса индеек (ВГИ).

Целью настоящей работы являлось проведение теоретического и экспериментального обоснования возможности разработки новых вакцинных препаратов против болезни Марека.

Сухие и восстановленные физиологическим раствором ультразвуковые лизаты клеток, инфицированных ВГК и ВГИ, подвергали термоденатурации. Специфичность, антигенную и инфекционную активность термообработанных и необработанных клеточных лизатов устанавливали методом ИФА и титрованием на культурах клеток эмбрионов SPF-кур.

В препаратах вируса герпеса индеек, термообработанных в сухом виде при 100° С, инфекционность вируса через 15 мин резко снижалась (на 98 %) и полностью исчезала через 30 мин. Структурные компоненты антигена, перекрестно реагирующего в ИФА с антителом к ВБМ и с антителом к ВГИ, полностью сохранялись в течение всего периода термообработки. Следовательно, при таком способе воздействия на сухие препараты вирусные антигены, реагирующие с антителом к ВБМ и с антителом к ВГИ, оказались термостабильными.