

## ПОЛУЧЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛИПАЗЫ LipA ПУТЕМ ВНЕСЕНИЯ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ НА ОСНОВЕ РАСЧЕТОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Д.А. Черенков<sup>1</sup>, А.А. Толкачёва<sup>1</sup>, М. С. Кондратьев<sup>2</sup>, М.Г. Шарапов<sup>2</sup>, Н.В. Пеньков<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия

<sup>2</sup> Институт биофизики клетки РАН, Москва, Россия

На предприятиях пищевой и химической отраслей промышленности образуются различные формы загрязнителей липидной природы, чрезвычайно трудно поддающиеся естественному разложению. Эти загрязнители могут быть представлены маслами, жирами, восками и другими липидами. В качестве одного из средств расщепления загрязнителей липидной природы могут быть предложены ферментные системы на основе липаз. Однако ограничением применения липаз в промышленности является их низкая термостабильность. С целью повышения термостабильности ферментов и, в частности, липазы LipA, нами были использованы методы биоинженерии на основе расчетов молекулярной динамики, разработанных в Лаборатории структуры и динамики биомолекулярных систем Института биофизики клетки РАН. Метод расчетов предполагает новый подход к повышению термостабильности малых глобулярных белков путем обоснованного увеличения количества альтернативных водородных связей между боковыми группами заряженных аминокислотных остатков на поверхности глобулы. Перечень аминокислотных остатков для проведения замен и сами варианты мутаций были предложены нами в результате анализа пространственной структуры каждого из исследуемых белков на графической станции nVidia Quadro FX380 с комплектом 3D Vision. Ген LipA с нативной структурой из *B. Subtilis* 168 был амплифицирован с применением соответствующих генспецифических праймеров, клонирован в вектор pET23b(+) (Novagen) по сайтам рестрикции EcoRI и XhoI. Полученными конструкциями трансформировали клетки *E. coli* Top10. Культуру клеток, содержащих рекомбинантную ДНК культивировали на среде LB с ампицилином. После индукции синтеза целевой белок выделяли методом аффинной хроматографии на Ni-агарозе. Термостабильность полученных мутантных форм фермента LipA определяли методом микрокалориметрии. Обнаружено, что каждая из проведенных аминокислотных замен повышает термостабильность молекулы фермента на 1,5 °С. Таким образом, нами подтверждена обоснованность применения расчетов молекулярной динамики с целью увеличения количества альтернативных водородных связей в молекуле фермента LipA, для повышения его термостабильности. Данный метод может быть применен для модификации ферментов промышленного назначения.