

Получение нового рекомбинантного ферментного препарата декстраназы и его прикладные свойства

Научный руководитель – Волков Павел Валерьевич

Горинов Ярослав Денисович

Студент (бакалавр)

Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Институт новых материалов и нанотехнологий, Москва, Россия

E-mail: inigerish@yandex.ru

Современной науке известно не так много гликозид-гидролаз, селективно конвертирующих «негативные» полисахариды, синтезируемые микробиотой. В настоящей работе описывается увеличение продуктивности полученного ранее штамма-продуцента рекомбинантной грибной декстраназы (rPrDex49), специфичной по отношению к -1,6-гликозидным связям, лежащим в основе химической связи полимера – декстрана, компонента биопленок. В исследуемом штамме *Pichia pastoris* ген декстраназы находится под контролем сильного АОХ1 промотора, индуцируемого метанолом. Для культивирования в 1-л биореакторе использовали лучший клон 12, обладающий *Mut⁺* фенотипом, значение активности которого по результатам скрининга в плашке составило 300 ед/мл. Ферментацию осуществляли по схеме, состоящей из двух этапов с начальной концентрацией биомассы - 47 г/л. Предварительный рост на глицерине в течение суток обеспечил быстрое и эффективное увеличение биомассы. Затем рост штамма вели с подпиткой метанолом (1% по объёму) и воздушной аэрацией ($30 \pm 5\% pO_2$) в течение 4-х суток. Каждые 6 ч отбирались пробы КЖ, в каждой из которых определяли активность rPrDex49 и концентрацию белка. Стоит отметить, что линейный рост активности декстраназы и роста биомассы в КЖ произошёл после 60-го часа, с включением подпитки метанолом и индукции АОХ-промотора, что говорит об оптимальных условиях культивирования штамма. При этом максимальные удельные темп роста биомассы (μ_{max}) и скорость накопления белка ($q_{p,max}$) к концу эксперимента составили 0.08 ч^{-1} и $0.0013 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$, соответственно. Заметный рост продуктивности по белку наблюдался в течение последних тридцати часов эксперимента в диапазоне от $q_p = 0.0002 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ до $q_{p,max}$. Подобранные условия культивирования позволили в 5,3 раза увеличить выход rPrDex49, активность которой в КЖ составила 1600 ед/мл, а в сухом препарате $\approx 60,000$ ед/г. Благодаря своей специфичности ферментный препарат (ФП) декстраназы может применяться в стоматологии как компонент зубных паст, разрушающий биоплёнки на поверхности эмали (преимущественно состоящие из декстрана) неабразивным образом и способствовать профилактике против кариеса и воспалений пародонта. Другое применение ФП декстраназы может найти при производстве антибактериальных ранозаживляющих повязок, ускоряя пролиферацию тканей и снижая величину области воспаления.

Иллюстрации

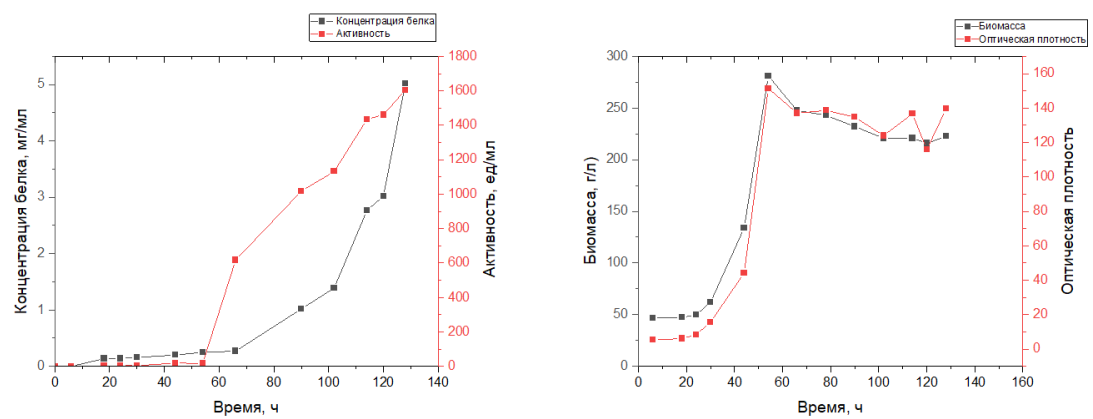


Рис. : А- Динамика накопления синтезированного белка и его измеренная активность единицы объёма КЖ. Б - Рост биомассы в ферментёре и оптическая плотность КЖ.