

Подбор оптимального носителя для иммобилизации фитазы *Pantoea* sp.3.5.1

Научный руководитель – Сулейманова Алия Дамировна

Трошагина Дарья Сергеевна

Аспирант

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной
медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия

E-mail: dashunka_@mail.ru

В настоящее время органические соединения мио-инозитол фосфаты привлекают биотехнологов с целью применения их в медицине. Доказана роль отдельных мио-инозитол фосфатов в защите от осложнений диабета, хронических воспалений и сердечно-сосудистых заболеваний, обнаружены противоопухолевые свойства. Однако получают эти соединения лишь химическим путем, тогда как альтернативная экономически выгодная технология их ферментативного получения не развита. Использование фитат-гидролизующих ферментов (фитаз) может внести свой вклад в получение инозитол фосфатов. Генерация данных соединений в промышленных масштабах возможна с помощью эффективной системы экспрессии фитазы для получения препаративных количеств фермента и последующей иммобилизацией белка на носителе, что может обеспечить возможность многократного использования фермента.

На предыдущем этапе работы нами была разработана система экспрессии гена бактериальной фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 в дрожжевом штамме *Yarrowia lipolytica* для внеклеточной продукции белка. Рекомбинантная фитаза была очищена из культуральной жидкости дрожжей с помощью аффинной хроматографии, изучены биохимические свойства фермента. Цель данной работы - подбор оптимального носителя для иммобилизации фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1.

В качестве носителя для иммобилизации фитазы AgrP использовалась сефароза 4В (GE Healthcare, Швеция). Показано, что иммобилизация фитазы AgrP на сефарозе 4В, активированной BrCN, приводит к потере активности фермента. Несмотря на наличие ковалентно связанного белка измерение активности показало отсутствие гидролиза субстрата. Вероятно, это связано с негативным воздействием высокого значения pH во время процесса иммобилизации, в то время как pH-стабильность фитазы AgrP находится в пределах pH 3 - 6. Кроме того, при иммобилизации на бромциан активированной сефарозе фитаза связывается с сорбентом напрямую, без линкера, что может создавать стерические затруднения для прохождения реакции. Для того, чтобы избежать негативного воздействия высоких значений pH и нивелировать стерический фактор была проведена иммобилизация на сефарозе через линкер (6-аминокапроновую кислоту). Для ковалентного связывания с карбоксильной группой аминокaproновой кислоты CN-сефароза 4В была активирована методом карбодиимидной активации. Оптимум pH для прохождения данной реакции находится в области низких значений pH (4.5-6) что является благоприятным для сохранения активности фитазы AgrP. Иммобилизация фермента на CN-сефарозу осуществлялась двумя способами. В первом варианте носитель активировали при помощи EDC (1-этил-3-диметиламинопропилкарбодиимид-HCl) предварительно, до добавления фитазы и фермент иммобилизовали с уже активированным носителем. Во втором варианте активация сорбента и иммобилизация фитазы осуществлялась одновременно. Результаты показали, что оптимальным способом является иммобилизация фитазы с предварительной активацией матрицы, активность фермента при этом составила 1,33 Ед/г сефарозы. Одновременная активация матрицы и иммобилизация фермента приводит к большей потере исходной

активности, что вероятно связано с образованием межмолекулярных ковалентных связей между карбоксильными группами с аминогруппами молекул фитазы и приводит к получению неактивных димеров и полимеров фермента. Активность фитазы при этом составила 0,33 Ед/ г сефарозы.