

БИОТЕХНОЛОГИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ А-ДЕКСТРИН- 6-ГЛЮКАНОГИДРОЛАЗЫ (ПУЛЛУЛАНАЗЫ)

С.С. Перкин, О.С. Корнеева, Г.П. Шуваева, В.Н. Ильичёва

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия

Среди множества способов изменения структуры крахмала особое внимание уделяется ферментативному гидролизу, поскольку этот процесс отличается экологической чистотой, эффективностью и возможностью контроля над свойствами конечных продуктов.

Пуллулاناза — α -декстрин - 6-глюканогидролаза, фермент, позволяющий в процессе переработки различных видов крахмала получить более короткие цепи углеводов, при внесении которых улучшаются функциональные свойства продуктов. Это - улучшение текстуры, эластичности, упругости, гладкости, стабильности и устойчивости к термической обработке, повышению вязкости продуктов, что увеличивает их способность удерживать влагу и улучшает сенсорные свойства. Учитывая тот факт, что в России нет промышленного производства препаратов пуллуланы, разработка технологии данного вида энзима является весьма актуальной и необходимой.

Авторами представлены результаты исследований по биосинтезу пуллуланы штаммом *Bacillus licheniformis*.

Культивирование продуцента проводили при 35 - 37°C глубинным способом на шейкер-качалке при 200 об/мин в качалочных колбах объёмом 750 см³ и количестве среды 50 см³, доза инокулята составляла – 2 % по отношению к объёму питательной среды.

По окончании выращивания культуральную жидкость центрифугировали при 6000 об/мин в течение 15 - 20 мин. Биомассой пренебрегали, а надосадочную жидкость анализировали на наличие в ней активности целевого фермента. Активность пуллуланы определяли по разности значений редуцирующих веществ (РВ) при введении культуральной жидкости в реакционную смесь, состоящую из 0,5% раствора пуллулана, и без нее. Смесь инкубировали в течение 20 мин при 45 °С. Содержание РВ до и после ввода фермента определяли по методу Бертрона.

На процесс биосинтеза микроорганизмом фермента и его секрецию большое влияние оказывает состав питательной среды и условия культивирования.

За основу была выбрана питательная среда (%): крахмал – 1,3; K_2HPO_4 – 0,2; кукурузный экстракт – 0,3; дрожжевой экстракт – 0,3; пептон – 0,3; $CaCO_3$ – 0,1. В качестве источника углерода использовали крахмал, полученный из различного растительного сырья. С этой целью были взяты образцы картофельного, пшеничного, ржаного и кукурузного крахмалов. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Влияние вида крахмала на биосинтез пуллуланы *Bacillus licheniformis*

№	Используемый в составе среды крахмал	Пуллулاناзная активность, ед/100 см ³
1	Кукурузный	340 ±0,8
2	Ржаной	98 ±0,9 2
3	Пшеничный	229 ±1,2
4	Картофельный	366 ±1,2

В ходе эксперимента установлено, что содержание в питательной среде кукурузного крахмала достаточно сильно влияет на биосинтез пуллуланы. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Влияние количества крахмала на биосинтез пуллуланы *Bacillus licheniformis*

Показатель активности, ед/100 см ³	Количество вносимого в среду крахмала, %									
	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,1	1,2	1,3	1,5	2,0
Пуллулاناзная активность	127	190	213	238	289	310	357	386	383	366

С экспериментально установленной оптимальной массовой долей крахмала в среде изучалось влияние источников неорганического азота. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Влияние источников неорганического азота на биосинтез пуллулаказы *Bacillus licheniformis*

№	Источник азота (0,15% по азоту)	Биомасса, г/100 см ³	Активность, ед/100 см ³
1	KNO_3	0,15	119
2	NH_4NO_3	0,21	81
3	$(NH_4)_2SO_4$	0,32	89
4	$(NH_4)_2HPO_4$	0,89	272
5	NH_4Cl	0,53	145

Изучено и экспериментально показано, что оптимальная температура для роста *Bacillus licheniformis* и биосинтеза им пуллулаказы – 50 °С, рН питательной среды 7,0, длительность выращивания 48-54 ч.

Выводы: максимальное накопление пуллулаказы *Bacillus licheniformis* происходит при культивировании продуцента на оптимизированной питательной среде, при температуре 50 °С, рН 7,0 на (51,0 ± 3,0) ч роста и в 3,7 раза превышает продуктивность исходного уровня синтеза фермента.

УДК 632.959

DOI: <http://doi.org/10.20914/2304-4691-2025-3-19-20>

ОСОБЕННОСТИ ДИЗАЙНА ПЛАЗМИД ДЛЯ ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ ГРИБОВ

И.Г. Синельников, Ю.М. Веригина, К.А. Демидова

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия

Развитие методов точного редактирования генома на основе системы CRISPR/Cas9 открыло новые возможности для исследования и инженерии микроорганизмов, включая промышленно значимые штаммы грибов, такие как *Trichoderma reesei* и *Aspergillus niger*. Система CRISPR/Cas9 функционирует как РНК-направляемая эндонуклеаза: направляющая РНК (gRNA) связывается с целевым участком генома за счёт комплементарности, после чего белок Cas9 вносит двухцепочечный разрыв ДНК в заданной позиции. В клетке этот разрыв далее репарируется собственными механизмами - либо путём негомологичного соединения концов (NHEJ), что способно привести к сдвигу рамки считывания и нокауту целевого гена, либо посредством гомологичной рекомбинации (HDR) с использованием шаблона для репарации. Эффективность технологии в значительной степени определяется уровнем экспрессии направляющих РНК (гРНК), которые должны транскрибироваться в клетке в достаточном количестве для формирования активного комплекса с нуклеазой Cas9. При этом подбор подходящего промотора для транскрипции гРНК остаётся ключевой задачей, поскольку от уровня транскрипции gRNA напрямую зависит эффективность работы системы.

В настоящей работе проведено тестирование различных вариантов экспрессии gRNA и оценка их эффективности для редактирования геномов *T. reesei* и *A. niger*. Для работы была создана универсальная плазмидная конструкция pFcas (Рисунок 1) на базе автономно реплицирующего региона (AMAI), гена устойчивости к гигромицину под контролем *ptef1* промотора *A. nidulans*, ген *cas9* под контролем сильного конститутивного промотора глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (*pGAPDH*) *A. nidulans*, кассеты для экспрессии gRNA, *ori* и ген устойчивости к ампициллину *AmpR* для поддержания плазмиды в *E. coli*. Дизайн плазмиды позволяет обеспечить одинаковый уровень экспрессии белка *cas9* и селекции трансформантов на гигромицине, а наличие *AMAI* препятствует интеграции плазмиды в хромосому трансформанта [1].

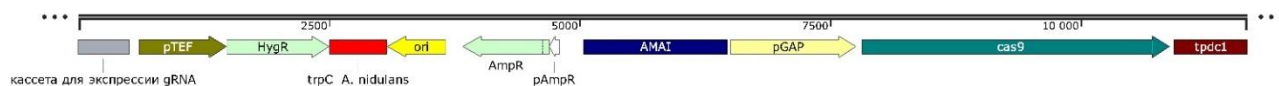


Рисунок 1 – структура базовой плазмиды pFcas