

## **„Otrzymywanie i charakterystyka biochemiczna nukleaz pochodzących z psychrofilnych mikroorganizmów *Desulfotalea psychrophila* LSv54, *Psychromonas ingrahamii* 37 i *Shewanella violacea* DSS12”**

**Kierownik projektu: mgr inż. Natalia Maciejewska**

### **Streszczenie:**

Podstawowym celem projektu badawczego jest otrzymanie i przeprowadzenie charakterystyki molekularnej nukleaz pochodzących z mikroorganizmów psychrofilnych *Desulfotalea psychrophila* LSv54, *Psychromonas ingrahamii* 37 i *Shewanella violacea* DSS12. W niniejszym projekcie zostanie opracowana najwydajniejsza metoda nadprodukcji wymienionych białek, a także ich efektywne oczyszczanie. Poznane zostaną właściwości biochemiczne otrzymanych enzymów. Dzięki realizacji projektu zbadana zostanie aktywność nukleaz w zależności od wielu parametrów. Zasób informacji na temat białek organizmów zimnolubnych jest wyjątkowo ograniczony, zwłaszcza jeśli weźmie się pod uwagę rozprzestrzenienie organizmów psychrofilnych w środowisku (około 85% biosfery ziemskiej to psychrosfera o temperaturach poniżej 5&730;C), m. in. ze względu na trudności w ich pozyskiwaniu. Jak na razie znanych jest zaledwie kilkanaście struktur białek pochodzenia psychrofilnego. Białka pochodzące z psychrofilnych mikroorganizmów charakteryzują się wysoką aktywnością w niskich temperaturach. Do jednych z najbardziej pożądaných zimnolubnych produktów mikrobiologicznych należą enzymy 8211; nukleazy.

Nukleazy są ważnymi narzędziami molekularnymi, należącymi do grupy hydrolaz, degradującymi kwasy nukleinowe. Obecnie w przemyśle stosowane są głównie enzymy pochodzące z drobnoustrojów mezofilnych lub termofilnych, produkowane na drodze biosyntezy, która jest technicznie łatwa do przeprowadzenia z powodu ich przystosowania do wzrostu w łagodnych warunkach temperaturowych. Aktualnie komercyjnie znane są jedynie dwie nukleazy degradujące każdą formę kwasu nukleinowego, co jest niezmiernie istotne w przemyśle biofarmaceutycznym do usuwania pyrogenów pochodzenia nukleinowego. Są to nukleazy działające w temperaturze powyżej 15186;C (co uniemożliwia ich zastosowanie do wrażliwych na temperaturę biofarmaceutyków), tj. Cryonase174; (pochodząca ze szczepu psychrotrofowego,  $T_{opt}=20186;C$ , Takara, Japonia) oraz Benzonase174; (pochodząca z mikroorganizmu mezofilnego  $T_{opt}=37186;C$ , Merck, USA). Do tej pory nikt nie otrzymał nukleaz ze szczepów psychrofilnych, dlatego jednym z zadań niniejszego projektu będzie ich otrzymanie oraz poznanie właściwości. Ze względu na pochodzenie (w 100% psychrofilne organizmy) wyprodukowane nukleazy najprawdopodobniej będą posiadać optimum aktywności w zakresie temperatur 4 - 10186;C.

Dzięki realizacji projektu zostanie poszerzona wiedza z zakresu białek organizmów ekstremofilnych. Prace badawcze nad ekstremofilami mają ogromne znaczenie poznawcze, ze względu na niezbadane do końca mechanizmy przystosowania ich metabolizmu do warunków środowiskowych. Wynikiem eksperymentów będzie m.in. określenie jak zimne warunki bytowania badanych mikroorganizmów wpłynęły na aktywność ich enzymów. Ponadto nukleazy działające w niskich temperaturach mogłyby być niezmiernie istotne w przemyśle biofarmaceutycznym, m.in. do usuwania pyrogenów pochodzenia nukleinowego z temperaturolabilnych biofarmaceutyków, co znacznie podwyższyłoby ich czystość i jakość. Jest to nadzwyczaj ważne ze względu na narzucone wytyczne prawne dotyczące zezwoleń na dopuszczenie do obrotu preparatów leczniczych i żywieniowych, w których zawartość zanieczyszczeń w postaci kwasów nukleinowych nie może być wyższa niż 100 pg w jednej dawce (wytyczne FDA ang. Food and Drug Administration, USA).