

С. В. Врублевский, мл. науч. сотрудник

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ФЕРМЕНТА ЛИПАЗЫ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ РОДА *ASPERGILLUS***

The work include materials on the resiving and purification of lipase by *Aspergillus awamori*. This lipase is extracted from the culture medium of *Aspergillus awamori*.

Мировой рынок ферментных препаратов является одним из наиболее прибыльных, стабильных и быстроразвивающихся.

Одним из промышленно важных ферментов, продуцируемых микроорганизмами, являются липазы (К.Ф. 3.1.1.3. — триацил-глицеролгидролазы), которые интенсивно исследуются во всем мире.

Ввиду их относительно широкой субстратной специфичности липазы используются с целью гидролиза разнообразных субстратов липидной природы. Это позволяет применять их прежде всего в тех областях, где необходим частичный или полный гидролиз жировых веществ: в фармацевтической промышленности, в животноводстве, в текстильной, химической промышленности и т. д.

Большое количество микроорганизмов способно утилизировать натуральные масла и жиры в качестве источника углерода для своего роста. Ферментами, ответственными за расщепление масел и жиров, предшествующее усвоению их микроорганизмами, являются липазы, которые катализируют гидролиз триглицеридов [1, 4, 5].

Наиболее перспективным источником липаз являются микроорганизмы, так как животное и растительное сырье не могут удовлетворить растущую потребность в этих препаратах.

Микроорганизмы, синтезирующие липолитические ферменты, широко распространены в природе. Продуцентами липаз являются многие микроорганизмы, относящиеся к различным таксономическим группам: бактерии, плесневые грибы, актиномицеты, дрожжи.

Для масштабного использования рекомендуются микроскопические грибы.

К грибным продуцентам липазы отнесены многочисленные представители рода *Aspergillus*: *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. luchuensis*, *A. awamori*, *A. ferricola*, а также *Rhizopus*, *Geotrichium*, *Penicilium*, *Mucor*, *Oospora*, *Humikola*.

В настоящей работе использована культура мицелиального гриба *A. awamori*. *A. awamori* оказалась активным продуцентом липолитических ферментов, культурой, которая по сравнению с другими видами плесневых грибов имеет ряд преимуществ. Она отличается

высокой способностью синтезировать внеклеточную липазу при глубинном культивировании. Кроме того, *A. awamori* обеспечивает стабильный рост на среде, содержащий в качестве источника углерода сам индуктор синтеза липазы [1].

Культура выращивалась глубинным способом на качалке с числом оборотов 200 в мин при температуре 25–30°C. Основное назначение качалки не только аэрация, но и эмульгирование масла, которое разбивается на многочисленные мелкие частицы, что делает масло более доступным для микроорганизмов. Время культивирования 72 ч (трое суток), pH 7,0–7,2. Использовали среду Чапека.

Для определения липолитической активности использовали титрометрический метод Ота и Ямада, основанный на определении свободных жирных кислот, образующихся при ферментативном гидролизе 40%-ной эмульсии оливкового масла.

**1. Первичная очистка культуральной жидкости**

Культуральную жидкость центрифугировали при 3000 об/мин, после чего фугат фильтровался через бумажный фильтр.

Далее фильтрат центрифугировался вторично при 8000 об/мин. После чего фугат вновь фильтровался через бумажный фильтр для удаления осадка меньшей плотности, чем сам фугат.

**2. Осаждение препарата с липолитической активностью**

Метод основан на осаждении белковых молекул из жидкостей путем их высаливания различными веществами как органического (например, ацетон), так и неорганического (ацетат свинца) происхождения. При этом некоторые осадители обладают специфичностью в данном процессе (изопропиловый спирт).

В качестве осадителей белка липазы из культуральной жидкости в эксперименте был исследован ряд общеизвестных высаливающих агентов: изопропиловый спирт, ацетон, ацетат свинца, сульфат аммония, аммиак, этиловый спирт.

Очищенную культуральную жидкость помещали в пластиковую пробирку для центрифуги и приливали осадитель в различных объемах (см. табл. 1).

Активность экстрацеллюлярной липазы *A. awamori* при очистке ее путем осаждения различными осадителями

Осадитель*	Масса белка пробы, г	Липолитическая активность пробы (ЛА)	Средняя ЛА/мг белка
Изопропиловый спирт 1 : 4	0,006 75	266	39,4±0,3
То же 1 : 2	0,001 74	43,30	24,8±0,3
Ацетон 1 : 2	0,001 78	43,30	24,4±0,2
То же 1 : 1	0,001 91	37,13	19,5±0,2
Ацетат свинца 1 : 0,1	0,008 26	192,0	23,2±0,2
То же 1 : 0,05	0,003 39	74,25	21,9±0,3
Этиловый спирт 1 : 2	0,003 01	—	—
То же 1 : 1	0,002 20	—	—
Сульфат аммония 1 : 0,5	0,002 95	9,0	3,1±0,3
То же 1 : 0,2	0,001 74	—	—
Аммиак 1 : 2	0,001 13	24,75	21,8±0,3
То же 1 : 1	0,000 76	12,40	16,3±0,2

\* После названия осадителя указано соотношение концентрат : осадитель.

Пробирки оставляли в холодильнике на сутки. Далее смесь центрифугировали 30 мин (по секундомеру) при 8000 об/мин. После проводили разделение осадка и надосадочной жидкости.

Все пробы с надосадочными жидкостями, полученными после осаждения, липолитической активности не проявили, что свидетельствует об отсутствии активного фермента в концентрате КЖ. Неодинаковая активность осадка при использовании различных осадителей свидетельствует о влиянии его природы на процесс обратимости денатурации данного фермента.

По данным табл. 1 видно, что изопропиловый спирт проявляет себя как наиболее выгодный осадитель, доказывая свою специфичность.

Далее осадок, полученный с помощью изопропилового спирта, был растворен в 5 см<sup>3</sup> фосфатного буфера. Активность растворенного в буфере осадка оказалась равной активности культуральной жидкости, что свидетельствует о полном осаждении липазы *A. awamori* из культуральной жидкости изопропиловым спиртом в соотношении 1 : 4.

Это позволяет применять его в ходе очистки экстрацеллюлярной липазы гриба *A. awamori* из культуральной жидкости до степени очистки ГЗх в пропорциях 1 : 4.

### 3. Гель-хроматография препарата с липолитической активностью

Хроматографию проводили на колонке 1,2 × 75 см с гелем TOYOPEARL HW-55, скорость элюирования 1 мл/(мин · см<sup>2</sup>), элюент — 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,0), фракции по 3,5 см<sup>3</sup> собирали в коллекторе FRACTION COLLECTOR FCC 61, элюент подавали с помощью перистальтического насоса НП-1М. Объем наносимой пробы 1 см<sup>3</sup>.

Калибровку колонки проводили, пропуская через нее белки с известной молекулярной массой — гемоглобин крупного рогатого скота (64 кДа), овальбумин (45 кДа), пепсин (32,7 кДа), цитохром С (11,7 кДа), и определяли объемы элюции для каждого из них.

Концентрированную форму липолитического препарата в количестве 1 см<sup>3</sup> нанесли на колонку и элюировали 0,1 М фосфатным буфером. В каждой пробе элюата определяли поглощение при 260 и 280 нм, а также измеряли липолитическую активность каждой пробы (см. табл. 2).

Как видно из табл. 2, активность проявляется только в двух «рядом стоящих» пробах, что свидетельствует о наличии только одного белка с липолитической активностью в препарате.

В силу того что молекулярная масса данного белка составляет около 60 кДа, было сделано предположение о субъединичности структуры данного белка.

Поглощение и липолитическая активность отдельных фракций белков из концентрированного препарата липазы из *KJ A. awamori*

№ пробы	Поглощение при 260 нм	Поглощение при 280 нм	Объем пробы, см <sup>3</sup>	Объем элюата, см <sup>3</sup>	Липолитическая активность, ед.
1	0,065	0,060	3,40	3,40	—
2	0,095	0,050	3,45	6,85	—
3	0,085	0,050	3,50	10,35	—
4	0,040	0,050	3,55	13,90	—
5	0,065	0,050	3,55	17,45	—
6	0,065	0,050	3,60	21,05	—
7	0,06	0,045	3,40	24,45	—
8	0,254	0,210	3,40	27,85	—
9	0,900	0,850	3,50	31,35	—
10	0,165	0,150	3,50	34,85	—
11	0,095	0,085	3,40	38,25	—
12	0,100	0,110	3,60	41,85	—
13	0,230	0,370	3,60	45,45	—
14	0,490	0,850	3,50	48,95	970±30
15	0,400	0,630	3,45	52,40	720±25
16	0,280	0,340	3,60	56,00	—
17	0,400	0,370	3,60	59,60	—
18	0,740	0,580	3,60	63,20	—
19	0,650	0,550	3,59	66,79	—
20	0,480	0,430	3,60	70,39	—
21	0,590	0,420	3,60	73,99	—
22	0,620	0,400	3,60	77,59	—
23	0,340	0,250	3,60	81,19	—
24	0,290	0,185	3,59	84,78	—
25	0,210	0,155	3,45	88,23	—
26	0,185	0,140	3,60	91,73	—
27	0,150	0,120	3,60	95,43	—
28	0,145	0,110	3,65	99,08	—
29	0,140	0,105	3,62	102,70	—
30	0,120	0,090	3,40	106,10	—

Таким образом, с целью разделения белка на отдельные субъединицы выделенные фракции, обладающие липолитической активностью, инкубировали в 6 М растворе мочевины (мочевина марки о.с.ч.) в течение 24 ч. Далее полученный раствор в количестве 1 см<sup>3</sup> наносили на хроматографическую колонку и разделяли таким образом отдельные полипептиды.

В качестве носителя в данном случае использовали 6 М раствор мочевины. Для данного вида носителя также был составлен калибровочный график.

Однако липолитическая активность не была обнаружена ни в одной из фракций. Таким образом, сделано предположение о том, что каждая отдельная субъединица не способна проявлять

липолитическую активность самостоятельно либо 6 М раствор мочевины денатурирует субъединицы фермента липазы из *A. awamori*.

#### 4. Электрофорез препаратов с липолитической активностью и их субъединиц

Для определения чистоты полученных ферментных препаратов, а также определения молекулярных масс составляющих их субъединиц был проведен электрофорез фракций, обладающих липолитической активностью, а также субъединиц белков, составляющих данные фракции.

Электрофорез проводился на пластинах размером 10 × 10 см в 12%-ном полиакриламидном геле при напряжении 245 В и силе тока 24 А. рН 7,0 поддерживался фосфатным буфером.

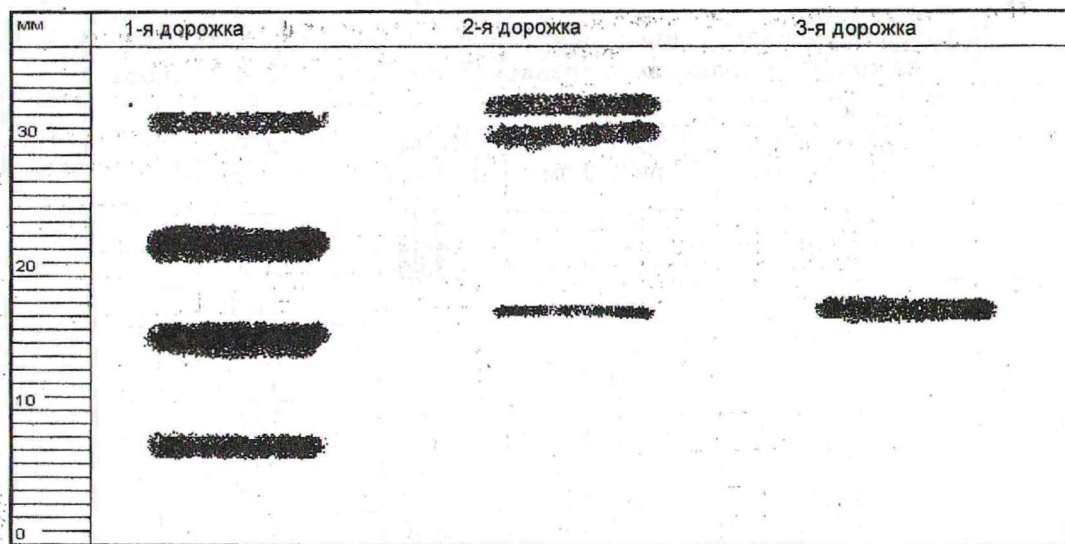


Рисунок. Электрофореграмма липолитически активных фракций белков и их субъединиц

В качестве белков сравнения использовался стандарт фирмы Fluka для электрофореза с белками молекулярной массы 94, 67, 49 и 32 кДа.

Результаты электрофореза представлены на рисунке.

Как видно из рисунка, липаза *A. awamori* обладает молекулярной массой  $\approx 60$  кДа и имеет субъединичную структуру.

#### Литература

1. Арендс И. М. Синтез липазы культурой гриба *A. awamori* в глубинных условиях // Ферменты микроорганизмов. – 1973. – С. 189–197.

2. Безбородов А. М. Биохимические основы микробного синтеза. – М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1984. – С. 304.

3. Давранов К. Д. Микробные липазы в биотехнологии // Прикл. биохимия и микробиология. – 1994. – Т. 30. – Вып. 4–5. – С. 527–534.

4. Давранов К. Д., Табак М. Я., Сатаров А. С. Препаратное выделение, очистка, кристаллизация и некоторые свойства липазы из *Oospora lactis* // Биохимия. – Т. 54. – Вып. 11. – С. 1866–1872.

5. Рубан Л. Е. Микробные липиды и липазы. – М: Наука, 1977. – С. 185–187.