

<https://doi.org/10.29296/25419218-2018-05-05>

© Коллектив авторов, 2018
УДК 615.334:615.355].012
<https://doi.org/10.29296/25419218-2018-05-05>

Получение высокоочищенного раствора кислой протеазы из нативного раствора *Aspergillus oryzae*

О.Я. Свиридова, Г.Д. Давтян, Н.В. Котова, Е.П. Яковлева
Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет;
Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Свиридова Ольга Яковлевна – магистрант 2-го года обучения, кафедра биотехнологии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета (СПХФУ). Тел.: +7 (952) 387-51-52. E-mail: ol.swiridowa2013@yandex.ru

Котова Наталия Владимировна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии СПХФУ. Тел.: +7 (921) 926-44-35. E-mail: kotntvl@mail.ru

Яковлева Елена Павловна – доктор биологических наук, профессор кафедры биотехнологии СПХФУ. Тел.: +7 (921) 776-28-25. E-mail: elena.yakovleva@pharminnotech.com

Давтян Гаянэ Давидовна – магистрант 1-го года обучения, кафедра биотехнологии СПХФУ. Тел.: +7 (950) 026-87-54. E-mail: gayane_davtyan_1995@mail.ru

Введение. Большинство современных ферментных препаратов, представленных на рынке, получены из сырья растительного или животного происхождения. Процесс выделения энзимов из подобных источников трудоемок и требует значительных материальных затрат. Наиболее дешевым источником кислых протеаз и α -амилаз являются плесневые грибы.

Цель работы – получение высокоочищенного раствора кислой протеазы из нативного раствора плесневого гриба *Aspergillus oryzae*.

Материал и методы. Объект исследования – кислая протеаза нативного раствора *Aspergillus oryzae* шт. 55. Протеолитическую активность определяли методом Ансона, общий белок – по методу Лоури. Осаждение кислой протеазы проводили с применением органических растворителей различной концентрации (этилового спирта, ацетона) и неорганического электролита (сульфата аммония).

Результаты. Исследован компонентный состав нативного раствора, который оказался неоднородным по белку. Установлена молекулярная масса кислой протеазы *Aspergillus oryzae* – 41 кДа. Показано, что наиболее эффективно процесс осаждения проходит при использовании в качестве осаждающего агента сульфата аммония. Выявлено, что при изменении степени насыщения нативного раствора сульфатом аммония происходит фракционирование белков. Результаты эксперимента свидетельствовали о концентрировании раствора фермента по протеолитической активности в 1,9 раза. При этом удельная активность кислой протеазы увеличивалась в 3 раза.

Заключение. Предложена технологическая схема эффективного метода выделения и очистки кислой протеазы из нативного раствора *Aspergillus oryzae* шт. 55.

Ключевые слова: кислая протеаза, *Aspergillus oryzae*, осаждение, ультрафильтрация.

Для цитирования: Свиридова О.Я., Давтян Г.Д., Котова Н.В., Яковлева Е.П. Получение высокоочищенного раствора кислой протеазы из нативного раствора *Aspergillus oryzae*. Фармация, 2018; 67 (5): 24–28. <https://doi.org/10.29296/25419218-2018-05-05>.

PREPARATION OF A HIGHLY PURIFIED ACID PROTEASE SOLUTION FROM AN ASPERGILLUS ORYZAE NATIVE SOLUTION

O.Ya. Sviridova, G.D. Davtyan, N.V. Kotova, E.P. Yakovleva

Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University; 14, Prof. Popov St., Saint Petersburg 197376, Russian Federation

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Sviridova Olga Yakovlevna – master student, Department of Biotechnology, St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. Tel.: +7 (952) 387-51-52. E-mail: ol.swiridowa2013@yandex.ru

Kotova Natalia Vladimirovna – PhD. (chemistry), associate prof., Department of Biotechnology, St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. Tel.: +7 (921) 926-44-35. E-mail: kotntvl@mail.ru

Davtyan Gayane Davidovna – master student, Department of Biotechnology, St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. Tel.: +7 (950) 026-87-54. E-mail: gayane_davtyan_1995@mail.ru

Yakovleva Elena Pavlovna, Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Biotechnology St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. Tel.: +7 (921) 776-28-25. E-mail: elena.yakovleva@pharminnotech.com

SUMMARY

Introduction. Most of the currently available enzyme preparations on the market are derived from raw materials of plant or animal origin. The process of isolation of enzymes from these sources is laborious and requires significant material costs. The cheapest source of acid proteases and α -amylases are molds.

Objective: to prepare a highly purified acid protease solution from a native solution of the mold.

Material and methods. The investigation object was acid protease from a native solution of 55 strains of *Aspergillus oryzae*. The investigators performed the Anson assay for measuring proteolytic activity and the Lowry method for total protein analysis. Acid protease was precipitated using organic solvents (ethanol, acetone) at different concentrations and inorganic electrolytes (ammonium sulfate).

Results. The component composition of the native solution that turned out to exhibit heterogeneity in protein was investigated. The molecular weight of acid protease from *Aspergillus oryzae* was found to be 41 kDa. The precipitation process was shown to be most effective when ammonium sulfate was used as a precipitating agent. When there was a change in the level of ammonium sulfate saturation in the native solution, protein fractionation was ascertained to occur. The experimental results showed that there was a 1.9-fold concentration in enzyme solution in terms of proteolytic activity. The specific activity of acid protease increased by 3 times.

Conclusion. The authors have proposed a flow chart for an effective method to isolate and purify acid protease from the native solution of 55 strains of *Aspergillus oryzae*.

Key words: acid protease, *Aspergillus oryzae*, precipitation, ultrafiltration.

For citation: Sviridova O.Ya., Davtyan G.D., Kotova N.V., Yakovleva E.P. Preparation of a highly purified acid protease solution from an *Aspergillus oryzae* native solution. Farmatsiya (Pharmacy), 67 (5): 24–28. <https://doi.org/10.29296/25419218-2018-05-05>.

Введение

Кислая протеаза – фермент, способный к эффективному гидролизу белка и сохраняющий стабильность в кислых средах [1]. Данное свойство позволяет устранить основной недостаток большинства современных энзимных препаратов, теряющих способность выполнять свои функции в кислой среде желудка [2]. Использование в качестве источника кислых протеаз плесневого гриба *Aspergillus oryzae* решает вторую существенную проблему, возникающую при получении ферментных лекарственных средств (ЛС) из растительных и животных источников, – недостаток исходного сырья. Гриб не патогенен, способен к росту в различных условиях на дешевых питательных средах.

Цель работы – получение высокоочищенного раствора кислой протеазы из культуральной жидкости *Aspergillus oryzae* с использованием различных осаждающих агентов по мембранной технологии.

Материал и методы

Культивирование гриба *Aspergillus oryzae* шт. 55 для получения культуральной жидкости проводили глубинным методом на жидкой питательной среде. В качестве посевного материала использовали суспензию спор культуры гриба, выросшего в пробирке на скошенном сусле-агаре [3].

Общую концентрацию белка определяли методом Лоури, протеолитическую активность – модифицированным методом Ансона, с использованием в качестве субстрата бычьего гемоглобина марки А [4]. Компонентный состав нативного рас-

твора культуральной жидкости *Aspergillus oryzae* рассчитывали методом элютивной гельхроматографии на лабораторной колонке $D \times H = 1,0 \times 20$ см. В качестве молекулярно-ситового геля применяли сефадекс фирмы «Sigma» марки G-75.

Процесс осаждения кислой протеазы из нативного раствора выполняли с помощью: органических растворителей (этилового спирта концентрацией 96, 70 и 50%; ацетона концентрацией 100, 70 и 50%) и неорганического электролита – сульфата аммония $(NH_4)_2SO_4$.

Процесс ультра- и диафильтрации осуществляли на ультрафильтрационной установке Vivaflow 200 (Sartorius) тангенсального типа с номинальным отсечением по молекулярной массе 30 кДа.

Результаты и обсуждение

Согласно результатам исследования компонентного состава нативного раствора *Aspergillus oryzae* шт. 55 методом элютивной гельхроматографии, нативный раствор неоднороден по белку, около 50% его состава представляют собой неактивные белковые примеси [5]. Активные ферменты – кислая протеаза, амилаза и липаза. По пикам, соответствующим наибольшей активности ферментов (рис. 1), установлены их молекулярные массы: кислая протеаза – 41 кДа, амилаза – 56 кДа.

Для подтверждения полученных результатов проведен электрофорез нативного раствора (рис. 2). Данные электрофореграммы полностью подтверждают результаты, полученные в ходе гельхроматографии.

В ходе электрофоретического исследования также была обнаружена белковая фракция, моле-

кулярная масса которой составила ~32 кДа. Данная полоса была идентифицирована как липолитический фермент.

Для выбора оптимального времени осаждения целевого белка изучали зависимость выхода кислой протеазы от времени проведения процес-

са. В качестве оптимального времени выбирали 30 мин, поскольку дальнейшее его увеличение нецелесообразно, так как не повышало выход целевого фермента.

Процесс осаждения кислой протеазы *Aspergillus oryzae* органическими растворителями (этиловый спирт и ацетон) осуществля-

ли с постепенным повышением концентраций этилового спирта и ацетона, а также варьируя объёмные соотношения исследуемого нативного раствора (V_1), содержащего целевой продукт, и осаждающего агента (V_2).

Гистограммы (рис. 3, 4) показывают, что при осаждении кислой протеазы различными концентрациями этилового спирта наблюдается осаждение, как кислой протеазы, так и других белковых молекул; максимальный выход составил порядка 90% (при осаждении 96% этиловым спиртом при соотношении объёмов нативного раствора и растворителя 1:3). В данном случае выход практически не зависит от концентрации этилового спирта, но повышается в зависимости от степени насыщения раствора. При этом достигается высокий выход кислой протеазы, но вместе с ней осаждаются и другие белки,

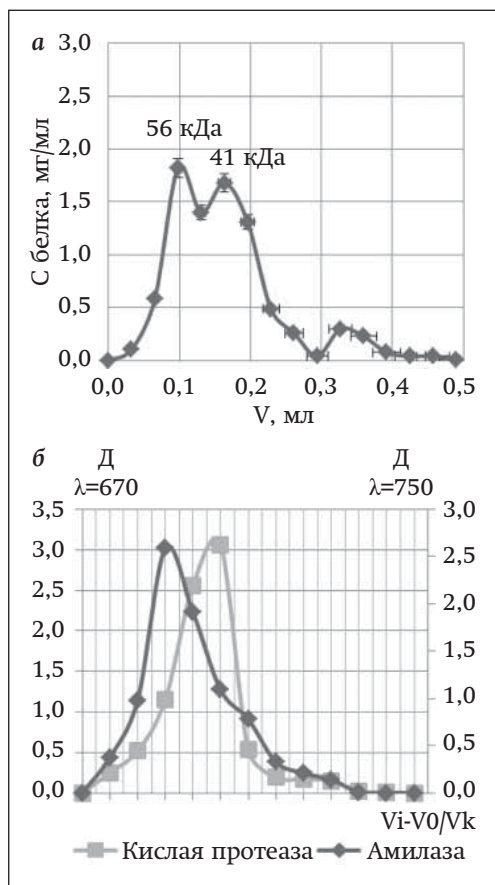


Рис. 1. Гельхроматограмма нативного раствора гриба *Aspergillus oryzae* шт. 55: а – по белку; б – по активности кислой протеазы и α -амилазы

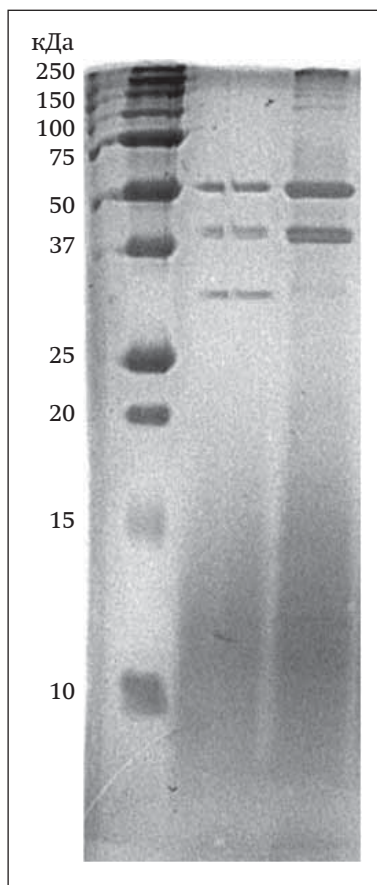


Рис. 2. Электрофорез нативного раствора гриба *Aspergillus oryzae* шт. 55 в полиакриламидном геле

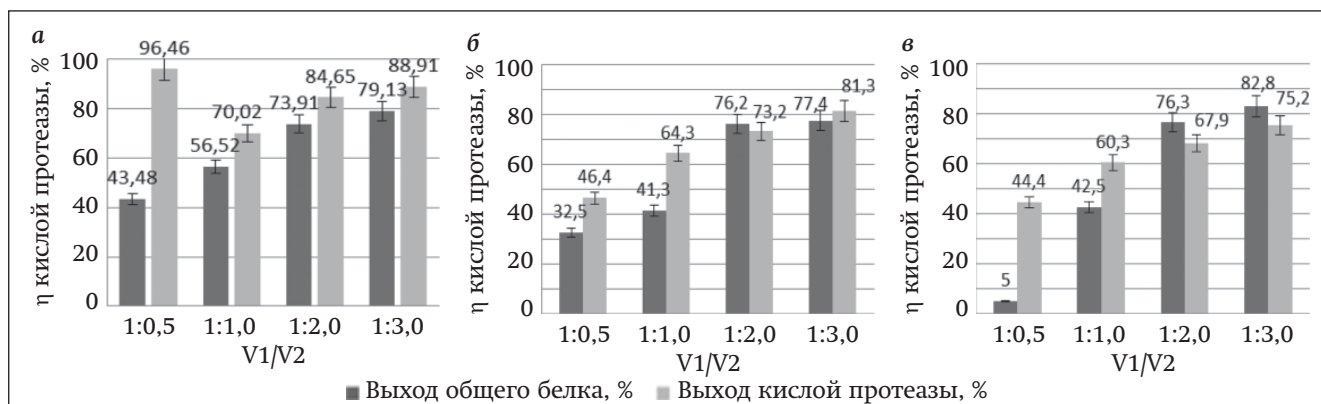


Рис. 3. Осаждение кислой протеазы гриба *Aspergillus oryzae* шт. 55: а – 95% этиловым спиртом; б – 70% этиловым спиртом; в – 50% этиловым спиртом

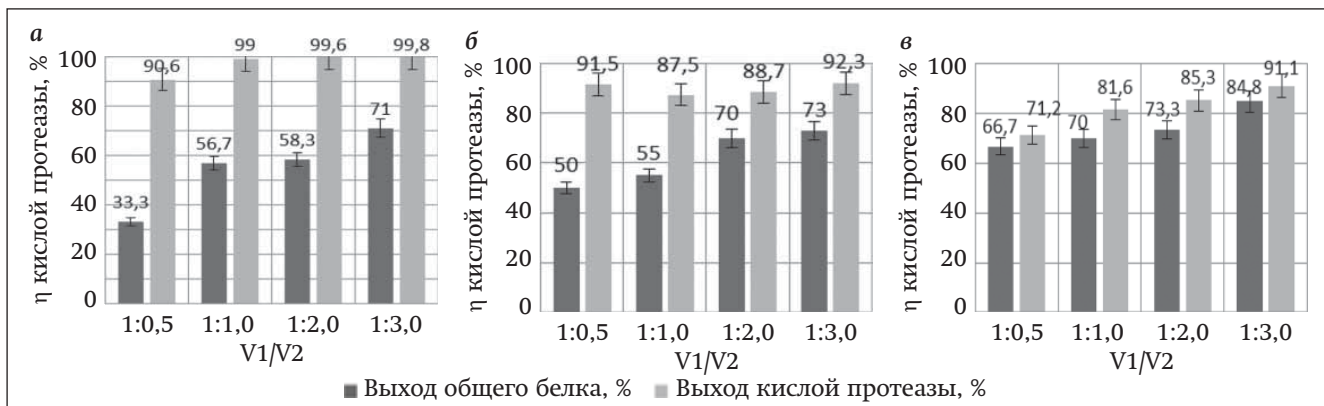


Рис. 4. Осаждение кислой протеазы гриба *Aspergillus oryzae* шт. 55: а – 100% ацетоном; б – 70% ацетоном; в – 50% ацетоном

т.е. эффективного фракционирования не наблюдается. Аналогичная зависимость наблюдается при использовании в качестве растворителя ацетона.

Результаты изучения зависимости выхода кислой протеазы *Aspergillus oryzae* от степени насыщения нативного раствора сульфатом аммония показали, что при степени насыщения нативного раствора сульфатом аммония 0,1 и 0,2 кислая протеаза не выпадает в осадок, однако удаляется часть балластных белков (рис.5.). При степени насыщения 0,3–0,4 осаждается незначительное количество кислой протеазы. Максимальный выход кислой протеазы на стадии осаждения был получен при степени насыщения 0,6 и составил 97%.

Таким образом, фракционирование белков можно осуществить, варьируя степень насыщения нативного раствора сульфатом аммония, т.е. удалить высокомолекулярные балластные белки при степени насыщения 0,1, а кислую протеазу осадить при степени насыщения нативного раствора 0,6.

Для концентрирования целевого продукта и его очистки от низкомолекулярного сульфата аммония был проведен процесс ультра- и диафильтрации. Растворителем служила очищенная вода.

Полученные результаты свидетельствовали о концентрировании раствора фермента по протеолитической активности в 1,9 раза (см. таблицу). При этом удельная активность кислой протеазы увеличивается в 3 раза.

Таким образом, для выделения и очистки раствора кислой протеазы из нативного раствора *Aspergillus oryzae* шт. 55 целесообразно использовать следующую технологическую схему: 1 – уда-



Рис. 5. Осаждение кислой протеазы гриба *Aspergillus oryzae* шт. 55: 50% кристаллическим сульфатом аммония

Результаты проведения процесса ультра- и диафильтрации раствора кислой протеазы *Aspergillus oryzae* шт. 55

Показатель	Концентрация общего белка, мг/мл	Протеолитическая активность, мкАу/мл	Удельная активность, мкАу/мг
Раствор фермента	6,13±0,02	5,02±0,02	0,82±0,02
Ультрафильтрация			
Фильтрат 1	1,59±0,02	1,4±0,02	0,12±0,02
Концентрат 1	10,60±0,02	6,00±0,02	1,86±0,02
Диафильтрация			
Фильтрат 2	0,40±0,02	0,8±0,02	0,10±0,02
Концентрат 2	10,20±0,02	9,56±0,02	2,59±0,02

ление высокомолекулярных балластных белков при степени насыщения нативного раствора сульфатом аммония 0,1; 2 – осаждение кислой протеазы при степени насыщения нативного раствора сульфатом аммония 0,6; 3 – концентрирование и очистка раствора фермента от низкомолекулярных примесей методом ультра – и диафильтрации.

Заключение

В ходе проведенного исследования установлен состав культуральной жидкости гриба *Aspergillus oryzae* шт. 55. Определена молекулярная масса кислой протеазы (41 кДа) и амилазы (57 кДа). Изучено выделение кислой протеазы из нативного раствора гриба различными методами осаждения. Показано, что при осаждении сульфатом аммония происходит эффективное фракционирование белков, причем выход кислой протеазы составляет 97% при степени насыщения раствора 0,6. Применение мембранной технологии позволяет сконцентрировать полученный раствор фермента по протеолитической активности в 1,9 раза и повысить удельную активность в 3 раза. Выход на стадии ультра-диафильтрации составил 98%.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература

1. Кислая протеаза [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://humbio.ru/humbio/tarantul_sl/00000a63.htm

2. Охлобыстин А.В. Современные возможности ферментной терапии. РМЖ, 2003; 5: 297.

3. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. М.: Агропромиздат, 1985; 203.

4. Рухляева А.П., Польшагина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981; 288.

5. Свиридова О.Я. Молодая фармация – потенциал будущего. Материалы VI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием. 25–26 апреля 2017 г. СПб., 2017; 418–21.

6. Чуешов В.И., Гладух Е.В., Сайко И.В. Технология лекарств промышленного производства. Винница: Новая Книга, 2014; 353.

7. Муравьев И.А. Технология лекарств. М.: Медицина, 1980; 280.

8. Сова В.В., Кусайкин М.И. Выделение и очистка белков. Владивосток: Изд. Дальневосточного университета, 2006; 42.

Поступила 28 февраля 2018 г.

References

1. Acid protease. [Electronic resource]. Access mode: http://humbio.ru/humbio/tarantul_sl/00000a63.htm

2. Okhlobystin A.V. Modern possibilities of enzyme therapy. RMC, 2003; 5: 297.

3. Gracheva I.M. Technology of enzyme preparations. Moscow: Agropromizdat, 1985; 203.

4. Rukhlyadeva A.P., Polygalina G.V. Methods for determining the activity of hydrolytic enzymes. Moscow: Legkaya i pishhevaya promishlennost, 1981; 288.

5. Sviridova O.Ya. Young pharmacy – potential of the future. Collection of materials of the VI All-Russian scientific conference of students and graduate students with international participation. April 25-26, 2017. St.-Petersburg, 2017; 418–21.

6. Chueshov V.I., Gladukh E.V., Saiko I.V. Technology of medicines of industrial production. Vinnitsa: Novaya Kniga, 2014; 353.

7. Muravyov I.A. Technology of medicines. Moscow: Medicine, 1980; 280.

8. Sova V.V., Kusaykin M.I. Isolation and purification of proteins. Vladivostok: Izdatelstvo Dalnevost. GU, 2006; 42.