



УДК 544

Получение высокоочищенных элюатов кислой протеазы из нативного раствора *Aspergillus oryzae* сорбционно-хроматографическим и мембранным методами

Свиридова О.Я., Котова Н.В.

Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 10.12.2018 г.

DOI: <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2019.19/785>

В работе представлены результаты экспериментов получения высокоочищенных элюатов кислой протеазы *Aspergillus oryzae* штамм 55 из нативного раствора на катионитах КУ-23, С-106, КБ-2. Установлено, что нативный раствор *Aspergillus oryzae* не однороден по белку и молекулярная масса кислой протеазы составила 41 кДа. Показано, что максимальный выход целевого продукта достигается на сульфокатионите КУ-23, и составляет 66% на стадии сорбции и 76% на стадии десорбции. Очистка элюата кислой протеазы с использованием ультра- и диафильтрации позволяет увеличить удельную активность в 4.5 раза.

Ключевые слова: кислая протеаза, *Aspergillus oryzae*, сорбция, сорбент, ультрафильтрация.

Preparation of highly purified eluates of acid protease from native solution *Aspergillus oryzae* by sorption-chromatographic and membrane methods

Sviridova O.Y., Kotova N.V.

St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, St. Petersburg

This paper presents the results of preparation of highly purified acid protease eluates from the native solution of *Aspergillus oryzae* strain 55. The analysis of the component composition of the native solution of the *Aspergillus oryzae* was carried out by the elution gel chromatography method. In addition, the molecular weight of the acid protease of *Aspergillus oryzae* was determined. The study of the native solution by the method of electrophoresis confirmed the obtained data. Isolation and purification of acid protease from ballast impurities was performed by sorption on various cation exchangers and by ultrafiltration. Optimal conditions for sorption of acid protease from the native solution of *Aspergillus oryzae* on cation exchangers KU-23, C-106, KB-2 were chosen, and equilibrium parameters of sorption of acid protease on these sorbents were studied. Sorption isotherms were constructed and the distribution coefficient K_d was calculated. Isotherms of protease sorption on carboxyl cation exchangers (KB-2 and C-106) are characterized by the presence of a maximum. Sorption of the protease on the sulfate cationite KU-23 corresponds to the Langmuir model. The maximum selectivity and sorption capacity were obtained on the KU-23 and C-106 sorbents, the values are comparable and are $m=5800$ U/g, $K_d=36.2$ cm³/g for KU-23 and $m=5600$ U/g, $K_d=35.0$ cm³/g for C-106.

A kinetic-dynamic analysis of the sorption of acid protease on ionites C-106 and KU-23 with speed of process 0.4-0.9 ml/min was carried out. The maximum yield of the desired product was obtained on a KU-23 sulfate cationite at a process rate of $\omega=0.8$ cm³/min. It is shown that the maximum yield of the target product is achieved on the sulfocationite KU-23, and is 66% at the sorption stage and 76% at the desorption

stage. Purification of acid protease eluate using ultra - and diafiltration can increase the specific activity by 4.5 times.

Keywords: acid protease, *Aspergillus oryzae*, sorption, sorbent, ultrafiltration

Введение

Ферментные препараты медицинского назначения используют в заместительной терапии при развитии желудочно-кишечных патологий, связанных с недостаточностью секреции пищеварительных соков. Кроме того, энзимы являются эффективным дополнением к основному лечению различного рода гнойных ран, тромбозов, воспалительных заболеваний дыхательных путей [1].

Большинство современных ферментных препаратов получены из сырья животного или растительного происхождения. Однако процесс выделения ферментов из подобных источников лимитируется ограниченностью сырьевых ресурсов, сложностью производственной технологии и экономическими факторами. Наиболее перспективным является использование микроорганизмов в качестве источников ферментов. Такой метод получения является экономичным и упрощенным технически. Так же важным аспектом является возможность выращивания микроорганизмов на дешевых питательных средах, содержащих отходы других производств [2].

Целью данной работы являлось получение высокоочищенных элюатов кислой протеазы из нативного раствора плесневого гриба *Aspergillus oryzae* um.55 сорбционно-хроматографическими и мембранными методами.

Преимущество кислой протеазы *Aspergillus oryzae* заключается в способности сохранять гидролитические свойства в кислой среде. Благодаря этому, препарат на основе данного фермента не требует создания кислотоустойчивой оболочки.

Эксперимент

Культивирование гриба для получения активной культуральной жидкости проводили глубинным методом на жидкой питательной среде, в качестве посевного материала использовали суспензию спор культуры гриба, выросшего в пробирке на скошенном сусло-агаре.

Глубинное культивирование плесневого гриба *Aspergillus oryzae* шт. 55 проводили в колбах Эрленмейера объемом 750 см³ в жидкой питательной среде при непрерывном перемешивании на качалке со скоростью вращения 220 об/мин при температуре 28±10°С в течение 72 часов. Для культивирования использовали жидкую питательную среду, содержащую: глюкозу – 3%, крахмал – 3%, кукурузный экстракт – 3%, соевую муку – 2%, аммоний сернокислый – 0.2%, кальция карбонат – 0.3%, рН среды 6.7-7.0 [3].

Общую концентрацию белка определяли методом Лоури. Протеолитическую активность определяли модифицированным методом Ансона, с использованием в качестве субстрата бычьего гемоглобина (марки А) при рН реакционной смеси 3.0±0.2 [4]. Амилолитическую активность определяли методом, основанным на количественном определении прогидролизованного крахмала в результате его гидролиза ферментами амилолитического комплекса до декстринов различной молекулярной массы в стандартных условиях (температура 30°С, значение рН 4.7, продолжительность гидролиза 10 мин). Количество прогидролизованного крахмала определяли колориметрическим методом по степени окраски остаточного крахмала раствором йода при длине световой волны λ=670 нм в кюветах при толщине поглощающего свет слоя 10 мм. В качестве контроля использовался 1%-ный раствор крахмала объемом 10 см³, в который вместо раствора анализируемого фермента добавлялось

5.0 см³ очищенной воды. Полученная смесь прогревалась при температуре 30°C в течение 10 мин.

Компонентный состав нативного раствора культуральной жидкости *Aspergillus oryzae* определяли методом элютивной гель-хроматографии на лабораторной колонке d×H=1.0×20 см. В качестве молекулярно-ситового геля был использован сефадекс фирмы «Sigma» марки G-75.

Изучение равновесных параметров процесса сорбции кислой протеазы нативного раствора *Aspergillus oryzae* проводили в статических условиях на сорбентах КБ-2, КУ-23, С-106 (активность нативного раствора 20 ПЕ, концентрация сорбента 2 мг/см³; рН=3.0-3.5.) Для определения зависимости ёмкости сорбции от рН раствора в качестве исходного использовали нативный раствор кислой протеазы с активностью нативного раствора 20 ПЕ) при постоянном перемешивании на шейкере CERTOMAT МОП (n=200 об/мин) в течение 24 часов. По экспериментальным данным рассчитаны ёмкость сорбции, коэффициенты распределения Kd (см³/г) и построены изотермы сорбции [5]. Коэффициент распределения сорбируемого вещества между фазами раствора и сорбента (Kd, см³/г) рассчитывали графическим методом при равновесной концентрации белка в растворе 15 мг/см³.

Изучение процесса сорбции кислой протеазы в динамических условиях проводили на колонке d×H=0.6×5 см, с рабочими скоростями $\omega=0.4-0.9$ см³/мин. В качестве исходного раствора был выбран нативный раствор *Aspergillus oryzae* с активностью 20 ПЕ. Сорбцию и промывку сорбента проводили при рН 3.0-3.5, десорбцию при рН 9 (элюент – раствор аммиака). Десорбцию нативного раствора проводили раствором аммиака с рН≈9, t=10°C, подачей сверху вниз со скоростью 0.4 см³/мин. По окончании процесса определяли протеолитическую активность и концентрацию белка в растворе и рассчитывали выходы на стадиях сорбции и десорбции в процентах (%). В работе использовались сорбенты: макропористый сульфокатионит КУ-23, карбоксильный катионит КБ-2 и карбоксильный катионит фирмы «Purolite» С-106. Характеристика сорбентов представлена в таблице 1 [6].

Таблица 1. Физико-химические характеристики используемых сорбентов

Сорбент	Средний размер зерна сорбента, мм	Коэффициент набухания	Насыпная плотность, г/см ³	Функциональные группы
КБ-2	0.4	2.6	0.7	-COO ⁻
КУ-23	0.25-0.4	1.5	0.6	-SO ₃ H ⁺
С-106	0.4	2.2	0.7-0.8	-COO ⁻

Навески воздушно-сухих сорбентов промывали дистиллированной водой, чтобы очистить сорбент от мелких частиц и загрязнений. Затем сорбент заливали 1 М раствором HCl и оставляли на 24 часа, по истечении времени сорбент отмывали очищенной водой до значения рН=5-6. Далее тот же сорбент заливали 1 М NaOH и так же оставляли на 24 часа, по истечении времени сорбент отмывали дистиллированной водой до рН=5-6. Отфильтровывали и высушивали до постоянной массы. Обработанные сорбенты хранились в колбах с крышками, откуда необходимые навески отбирались по мере надобности для проведения экспериментов. Процесс ультра- и диафильтрации проводили на ультрафильтрационной установке Vivaflow 200 фирмы Sartorius тангенсального типа с номинальным отсечением по молекулярной массе 30кДа [7].

Математическую обработку результатов исследований проводили в соответствии с методиками, изложенными в [8]. В качестве меры разброса значений от

средней величины применяли выборочное среднеквадратичное отклонение единичного наблюдения.

Обсуждение результатов

Результаты исследования компонентного состава нативного раствора *Aspergillus oryzae* методом элютивной гель-хроматографии показали, что нативный раствор представляет собой сложную многокомпонентную систему, и помимо кислой протеазы содержит амилолитические ферменты и другие белковые примеси. По пикам, соответствующим наибольшей протеолитической и амилолитической активности, установлены молекулярные массы соответствующих ферментов – кислая протеаза 41 кДа и амилаза 56 кДа.

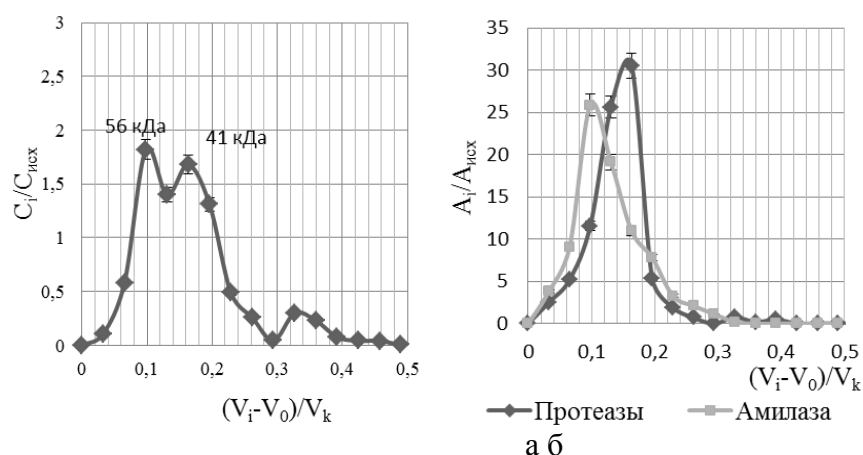


Рис. 1. Гель-хроматограмма нативного раствора гриба *Aspergillus oryzae* шт.55 а) по белку; б) по активности кислой протеазы и амилазы

Для подтверждения полученных результатов, помимо гель-хроматографии, было проведено электрофоретическое исследование (в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли) состава нативного раствора культуральной жидкости гриба *Aspergillus oryzae*, результаты которого приведены на рис. 2.

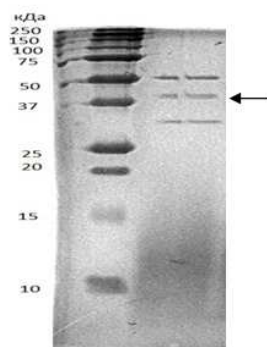


Рис. 2. Электрофореграмма нативного раствора гриба *Aspergillus oryzae* шт.55:1 полоса – маркеры; 2 полоса – проба нативного раствора (нанесение – 20 мкл исходного раствора); 3 полоса – проба нативного раствора (нанесение – 5 мкл исходного раствора)

Данные, приведённые на электрофореграмме, полностью подтверждают результаты, полученные в ходе гель-хроматографии. На электрофореграмме нативного раствора кислой протеазы видны две четкие полосы с маркерами, соответствующие

молекулярным массам 56 кДа-амилазы, 41 кДа кислой протеазы (рис. 2 стрелкой указана амилаза). Согласно литературными данным, эти значения молекулярных масс соответствуют микробной амилазе и кислой протеазе. Установлено, что нативный раствор имеет некоторое количество низкомолекулярных примесей с массой ниже 30 кДа.

Были подобраны оптимальные условия проведения процесса сорбции кислой протеазы нативного раствора *Aspergillus oryzae* на сорбентах КБ-2, КУ-23, С-106. На рис. 3 представлены зависимости емкости сорбции катионитов от pH раствора. Показано, что максимальная емкость сорбции кислой протеазы на данных сорбентах наблюдается при значениях pH 3.5-4.0. При этом, после достижения изоэлектрической точки, емкость сорбции постепенно уменьшается при увеличении pH в щелочную сторону (рис.3).

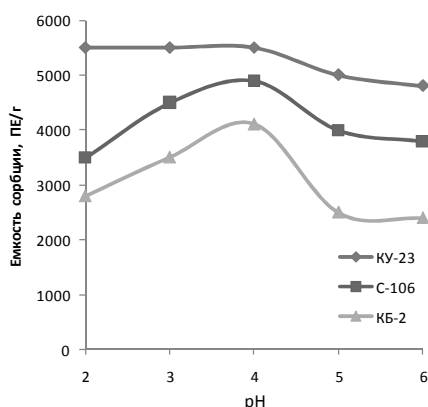


Рис. 3. Зависимость емкости сорбции кислой протеазы на катионитах КУ-23, С-106, КБ-2 от pH раствора

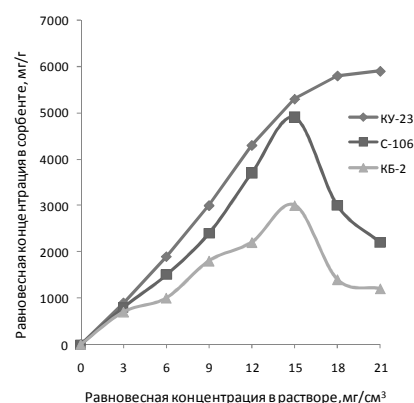


Рис. 4. Изотермы сорбции кислой протеазы *Aspergillus oryzae* шт.55 на катионитах КУ-23, С-106, КБ-2

Таким образом, для проведения процесса выделения кислой протеазы из нативного раствора выбраны значения $\text{pH} \approx 3.5-4.0$. Для изучения избирательности процесса сорбции протеазы построены изотермы сорбции на катионитах С-106, КБ-2 и КУ-23 (рис.4).

На изотермах сорбции кислой протеазы на карбоксильных катионитах (КБ-2 и С-106) наблюдается максимум (при концентрациях белка $c_{\text{кр}} > 15 \text{ мг/см}^3$), который проявляется вследствие того, что поры сорбента недоступны для макромолекулярных ассоциированных структур и емкость сорбента снижается [9]. Изотерма сорбции кислой протеазы на сульфокатионите КУ-23 соответствует модели Ленгмюра. Известно, что важнейшим параметром, характеризующим эффективность процесса сорбции вещества, является величина коэффициента распределения вещества K_d . Коэффициент распределения рассчитывали по изотермам сорбции. Показатели процесса сорбции представлены в таблице 2.

Таблица 2. Показатели процесса сорбции на исследуемых катионитах.

Сорбент	Емкость сорбции, м ПЕ/г	Коэффициент распределения, $K_d \text{ см}^3/\text{г}$
КУ-23	5800	36.2 ± 0.4
С-106	5600	35.0 ± 0.4
КБ-2	2200	13.75 ± 0.4

Установлено, что процесс сорбции кислой протеазы на КУ-23 и С-106 осуществляется с высокой избирательностью, K_d сопоставимы и составили 36.2; 35.0 соответственно. При этом емкость сорбции составила 5600-5800 ЕД/г. Результаты сорб-

ции на катионитах КУ-23 и С-106 в динамических условиях при различной скорости пропускания нативного раствора представлены в таблице 3.

Таблица 3. Выходы кислой протеазы на стадиях сорбции, десорбции на катионитах КУ-23 и С-106

Сорбент	Рабочая скорость процесса сорбции ω , см ³ /мин	Выход на стадии сорбции, %	Выход на стадии десорбции, %
КУ-23	0.4	41±0.5	71±0.5
	0.5	43±0.5	53±0.5
	0.6	51±0.5	70±0.5
	0.7	38±0.5	62±0.5
	0.8	66±0.5	76±0.5
	0.9	47±0.5	68±0.5
С-106	0.4	32±0.5	49±0.5
	0.5	40±0.5	49±0.5
	0.6	42±0.5	54±0.5
	0.7	40±0.5	46±0.5
	0.8	47±0.5	57±0.5
	0.9	44±0.5	55±0.5

Из таблицы 3 видно, что наибольший выход целевого продукта достигается при проведении процесса с рабочей скоростью $\omega=0.8$ см³/мин на сульфокатионите КУ-23 и составил 66 и 76% на стадиях сорбции, десорбции [9].

Наличие большого количества примесей в нативном растворе свидетельствует о необходимости дополнительной очистки элюатов от балластных веществ. Очистка проводилась с использованием модуля с номинальным отсечением по молекулярной массе 30кДа на ультрафильтрационной установке тангенциального типа (таблица 4).

Таблица 4. Экспериментальные данные по очистке элюатов мембранным способом

Исследуемая проба	Концентрация общего белка, мг/см ³	Протеолитическая активность, мкАу/ см ³	Удельная активность, мкАу/мг
Нативный раствор	3.46	0.704	0.115
Элюат	2.64	1.36	0.21
Концентрат	10.43	3.58	0.97

Установлено, что на стадии выделения активность кислой протеазы увеличивается в 1.5 раза, удельная активность в концентрате увеличивается приблизительно в 4.5 раза, при этом происходит концентрирование нативного раствора в 2.5 раза. Выход на стадии составил 98%. Таким образом, использование сорбционно-хроматографических и мембранных методов позволяет получить высокоочищенные растворы кислой протеазы.

Заключение

Установлено, что нативный раствор *Aspergillus oryzae* не однороден по белку и молекулярная масса кислой протеазы составила 41кДа. Подобраны оптимальные условия проведения процесса сорбции кислой протеазы из нативного раствора *Aspergillus oryzae* на катионитах КУ-23, С-106, КБ-2. Анализ выходных кривых процессов сорбции-десорбции кислой протеазы в динамических условиях показал, что максимальный выход целевого продукта достигается на сульфокатионите КУ-23, и

составляет 56% на стадии сорбции и 76% на стадии десорбции. Показано, что очистка элюата кислой протеазы с использованием ультра- и диафильтрации позволяет увеличить удельную активность в 4.5 раза и составляет 0.97 мкАу/мг.

Список литературы

1. Кольцова Э.В. Ферментные препараты медицинского назначения. Режим доступа: <http://mosapteki.ru/material/fermentnye-preparaty-medicinskogo-naznacheniya-1881> (дата обращения 29.01.2018).
2. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. М. Агропромиздат. 1985. 203 с.
3. Володина Е.В., Топкова О.В. // Сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции с междунар. участием «Инновации в здоровье нации». Санкт-Петербург. 8-9 ноября 2017 г. СПб. Изд-во СПХФА. 2017. С. 123-127.
4. Рухлядева А.П., Полыгалина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. М. Легкая и пищевая пр-ть. 1981. 288 с.
5. Самсонов Г.В., Тростянская Е.Б., Елькин Г.Э. Ионный обмен. Сорбция органических веществ. Л. Наука. 1969. 332 с.
6. Лейкин Ю.А. Физико-химические основы синтеза полимерных сорбентов: учебное пособие. М. БИНОМ. Лаборатория знаний. 2014. 413 с.
7. Груздева А.Н., Хамизов Р.Х., Золотарев П.П. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2008. Т. 8. №.1. С. 99-105.
8. Государственная фармакопея РФ XIII издание. М. 2015. Т. 1. 1468 с.
9. Свиридова О.Я. // «Молодая фармация – потенциал будущего», Фармация, сборник материалов VI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием. 25-26 апреля 2017 г. Санкт-Петербург. 2017. С. 418-421.

References

1. Kol'tsova E.V. Fermentnyye preparaty meditsinskogo naznacheniya. Rezhim dostupa: <http://mosapteki.ru/material/fermentnye-preparaty-medicinskogo-naznacheniya-1881> (data obrashcheniya 29.01.2018).
2. Gracheva I.M. Tekhnologiya fermentnykh preparatov, M., Agropromizdat, 1985, 203 p.
3. Volodina E.V., Topkova O.V., Collection of materials of the Vth All-Russian Scientific and Practical Conference with the Intern. participation of "Innovation in the health of the nation", St. Petersburg, November 8-9, 2017, St. Petersburg: SPHFA Publishing House, 2017. pp. 123-127.
4. Rukhlyadeva A.P., Polygalina G.V. Metody opredeleniya aktivnosti gidroliticheskikh fermentov, M., Legkaya i pishcheyaya pr-t', 1981, 288 p.
5. Samsonov G.V., Trostyanskaya Ye.B., Yel'kin G.E., Ionnyy obmen. Sorbtsiya organicheskikh veshchestv. L., Nauka, 1969, 332 p.
6. Leykin Yu.A. Fiziko-khimicheskiye osnovy sinteza polimernykh sorbentov: uchebnoye posobiye, M., BINOM, Laboratoriya znaniy, 2014, 413 p.
7. Gruzdeva A.N., Khamizov P.KH., Zolotarev P.P., *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*, 2008, Vol. 8, No 1, pp. 99-105.
8. State pharmacopeia RF XIII Edition, M., 2015, Vol. 1, 1468 p.
9. Sviridova O. YA., «Molodaya farmatsiya - potentsial budushchego», Farmatsiya, sbornik materialov VI Vserossiyskoy nauchnoy konferentsii studentov i aspirantov s mezhdunarodnym uchastiyem. 25-26 aprelya 2017 g. Sankt-Peterburg. 2017, pp. 418-421.

Свиридова Ольга Яковлевна – магистрант, кафедра биотехнологии, Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург

Котова Наталия Владимировна – доцент кафедры биотехнологии, к.х.н., Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург фармацевтическая академия, Санкт-Петербург, e-mail: kotntvl@mail.ru

Sviridova Olga Ya. - master student, department of biotechnology, St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, St. Petersburg, e-mail: ol.swiridowa2013@yandex.ru

Kotova Nataliya V. – Ph.D. (chemistry), associate prof., department of biotechnology, St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, St. Petersburg, e-mail: kotntvl@mail.ru