

УДК 577.15:582.282.23

ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ ИЗ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ЛВ-7

Артюхов В.Г., Ковалева Т.А., Кожокина О.М., Тоньшева Н.В.
Воронежский государственный университет, Воронеж

Разработана методика выделения и очистки глюкоамилазы, включающая стадии ультрафильтрации на мембране УФМ-50, осаждения изопропиловым спиртом и гель-хроматографии на сефадексах G-25 и G-150, которая позволила получить гомогенный препарат глюкоамилазы из *Saccharomyces cerevisiae* ЛВ-7 с 70-кратной степенью чистоты; кажущаяся молекулярная масса фермента - 99,8 кДа.

Выделение и очистка ферментных препаратов от примесей является важным этапом в изучении их свойств. Ферменты, как правило, выделяют непосредственно из биомассы гриба или из культуральной жидкости, а также из экстрактов поверхностной культуры.

Анализ данных литературы указывает на многообразие комбинаций используемых авторами методов получения амилолитических препаратов с высокой степенью чистоты [8, 11]. В этой связи мы изучили влияние на эффективность выделения и очистки глюкоамилазы из *Saccharomyces cerevisiae* ЛВ-7 различных органических растворителей, а также условий хроматографирования.

Культивирование продуцента проводили в лабораторных условиях в два этапа. Сначала дрожжи выращивали твердофазным способом в чашках Петри в течение 48 ч при температуре 26-27°C и рН субстрата 4,7-5,0, используя в качестве питательной среды агар-агар и солодовое неохмеленное сушло (8% сухого вещества). На втором этапе полученный инокулят вносили в колбы в мелассную среду (меласса – 10% сухого вещества) и осуществляли культивирование глубинным методом в течение 24 ч при температуре 30-32°C и рН субстрата 4,7-5,0. Готовую биомассу продуцента сушили 3-4 дня при 25-27°C, измельчали до порошкообразного состояния. Для разрушения клеточной стенки и перевода глюкоамилазы в раствор дрожжи тщательно растирали с песком или измельченным стеклом.

Экстракцию фермента проводили ацетатным буфером с рН 4,7 при постоянном перемешивании в течение 1,5-2,0 ч при температуре 20-22°C из 5% раствора дрожжей. Для концентрирования экстракта культуры дрожжей *S. cerevisiae* проводили ультрафильтрацию на мембране УФМ-50. Каталитическую активность глюкоамилазы определяли глюкозооксидазным методом реагентами “Оксохром Глюкоза С” (“Lachema”, Чехия), содержание белка в препарате - по методу

Лоури [7]. Очистку фермента от низкомолекулярных примесей осуществляли методом гель-хроматографии на сефадексе G-25, от высокомолекулярных - на сефадексе G-150. Контроль гомогенности глюкоамилазы проводили путем электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Дэвиса [3]. Окрашивание белковых полос осуществляли, используя нитрат серебра [14].

Известно, что белковые молекулы в присутствии органических растворителей способны образовывать агрегаты и выпадать в осадок, так как сила электростатического притяжения обратно пропорциональна диэлектрической постоянной среды, которая в данном случае уменьшается [1, 2]. В этой связи нами было изучено влияние различных концентраций (50,0-83,3%) ацетона, изопропилового и этилового спиртов на эффективность осаждения глюкоамилазы.

Анализ литературы показал, что при комнатной температуре большинство ферментов быстро денатурируется органическими растворителями [1, 7, 10]. Низкая температура не только предохраняет фермент от инактивации, но и усиливает осаждающее действие растворителей. Поэтому культуральную жидкость охлаждали до -2°C, органические растворители – до -6°C. Внесение осадителя в экстракт фермента проводили при постоянном перемешивании, поместив колбу в емкость со льдом. Далее осуществляли центрифугирование при 3000 g в течение 15 минут, полученный осадок растворяли в минимальном объеме ацетатного буфера (рН 4,7) для снижения в препарате концентрации органического растворителя.

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что использование органических растворителей в диапазоне концентраций 50,0-83,3% по-разному отражается на выходе глюкоамилазы и величине ее удельной активности.

Выявлено, что максимальный выход фермента 38,6% наблюдается после осаждения изо-

пропиловым спиртом в концентрации 80,0%, что на 1,5% больше по сравнению с действием этилового спирта и на 5,7% превышает данную величину для ацетона.

При более низких значениях концентрации органических растворителей процент выхода глюкоамилазы понижается незначительно, однако, удельная активность составляет лишь ~30% от максимальной величины. Высокие концентрации осадителей (83,3%) снижают каталитическую активность глюкоамилазы и уменьшают выход фермента на ~5%. Следовательно, осаждение глюкоамилазы из культуральной жидкости дрожжей *S. cerevisiae* ЛВ-7 целесообразно осуществлять с помощью 80,0% изопропилового спирта, т.к. именно в этом случае выход фермента максимален (38,6%), а удельная активность достаточно высокая (0,43 ед/мг).

Результаты наших экспериментов хорошо согласуются с данными литературы. Показана высокая эффективность применения изопропилового спирта для выделения амилолитического комплекса из экстракта поверхностной культуры *Aspergillus oryzae* [4, 13].

Получение ферментных препаратов основано на осаждении белка путем дегидратации его мицелл и снятия заряда гидрофильной молекулы органическими растворителями или нейтральными солями. При этом важную роль играет начальная величина концентрации ионов водорода ферментной вытяжки. Известно, что из одного и того же раствора при различных значениях pH можно получить неодинаковый выход осадков, содержащих разное количество фермента [1, 7]. Это связано с наиболее полным осаждением фермента при величине pH, соответствующей изоэлектрической точке данного белка. Так как для глюкоамилазы из дрожжей *S. cerevisiae* ЛВ-7 подобные данные отсутствуют, мы проводили осаждение изопропанолом в концентрации 80,0% из экстрактов, приготовленных на ацетатном буфере с диапазоном значений pH 3,5-6,0.

Обнаружено, что наибольший выход глюкоамилазы (37,3%) наблюдается в интервале величин pH 4,5-5,0 с максимумом при pH 4,7. В этом же диапазоне значений концентрации ионов водорода в среде фермент проявляет высокую каталитическую активность, максимальная величина которой зафиксирована при pH 4,7 и составляет 0,42 ед/мг, что вполне согласуется с данными литературы [6, 9, 15].

С целью выявления оптимальной для выделения глюкоамилазы концентрации культуральной жидкости дрожжей фермент осаждали 80% изопропиловым спиртом из экстрактов с 5-30% содержанием продуцента.

Установлено, что максимальные выход фермента и удельная активность (0,42 ед/мг) наблюдаются при 5% концентрации дрожжей в экстракте. С увеличением процента содержания продуцента в культуральной жидкости в осадок увлекается все большее количество балластных белков, что приводит к снижению выхода глюкоамилазы и уменьшению ее каталитической активности.

Таким образом, выделение глюкоамилазы целесообразно осуществлять 80% изопропиловым спиртом из 5% экстракта дрожжей, приготовленного на основе ацетатного буфера с pH 4,7.

Нами показано, что для осаждения глюкоамилазы из культуральной жидкости требуются большие объемы органического растворителя (1 объем экстракта : 4 объема изопропанола). Известно, что ультрафильтрация позволяет концентрировать и очищать от балластных соединений растворы высокомолекулярных веществ [12]. Для этого применяют полупроницаемые мембраны (ацетатцеллюлозные, на полиамидной основе и др.), обладающие способностью селективно пропускать различные компоненты фильтруемой жидкости. С целью концентрирования приготовленный 5% экстракт культуры дрожжей *S. cerevisiae* ЛВ-7 подвергали ультрафильтрации на мембране УФМ-50 (диаметр пор 0,05 мкм). Установлено (табл. 1), что в фильтрат переходит незначительное количество глюкоамилазы (около 2%). Культуральная жидкость была сконцентрирована в 3 раза, удельная активность фермента возросла в 6 раз, резко увеличился выход энзима по активности (со 100 до 274,8%). Из полученного концентрата глюкоамилазу осаждали 80% изопропиловым спиртом. Степень очистки фермента на данной стадии составляла 9,14, а удельная активность – 1,92 ед/мг. В связи с невысоким содержанием белка в полученном препарате (39,2 мг) высаливание сульфатом аммония не осуществляли.

Гель-фильтрация на сефадексе G-25 позволила увеличить степень очистки глюкоамилазы до 41,1. Уменьшение содержания белка, более чем в 14 раз, указывает на эффективное освобождение фермента от низкомолекулярных белков (например, альбуминов с $M_r = 16-32$ кДа) и других примесей.

Заключительной стадией очистки глюкоамилазы была гель-хроматография на сефадексе G-150. Элюцию фермента осуществляли ступенчато цитратно-фосфатным буфером (pH 4,7) со скоростью 12 мл/ч. Элюат собирали порциями по 3 мл и определяли в каждой из них количество белка и каталитическую активность глюкоамилазы, наиболее активные фракции объединяли. Выход

глюкоамилазы представлен одним пиком (рис. 1). В интервале объемов выхода 20-30 мл происходило элюирование балластных белков, так как каталитической активностью данные фракции не

обладали. Таким образом, нами был получен ферментный препарат глюкоамилазы с 70-кратной степенью очистки, удельной активностью 14,8 ед/мг (табл. 1).

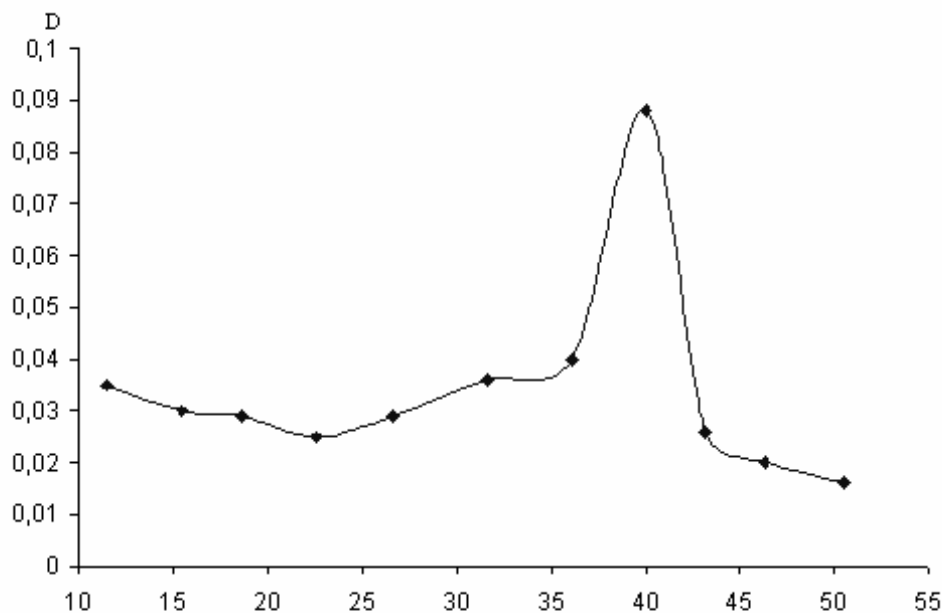


Рис. 1. Профиль элюции глюкоамилазы, выделенной из *Saccharomyces cerevisiae*, с колонки, упакованной сефадексом G-150

Таблица 1. Очистка глюкоамилазы из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ЛВ-7

Стадия очистки	Общая активность, ФЕ	Количество белка, мг	Удельная активность, ед/мг	Степень очистки	Выход, %
Культуральная жидкость	3628,8±22,7	384,0	0,21±0,01	1	100,0
Ультрафильтрация на УФМ-50	9972,0±37,4	554,0	1,20±0,03	5,7	274,8
Осаждение изопропиловым спиртом	752,6±6,9	39,2	1,92±0,06	9,14	20,7
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	580,6±5,2	11,2	8,64±0,12	41,1	16,0
Гель-хроматография на сефадексе G-150	142,1±2,1	1,6	14,8±0,22	70,5	4,0

Для определения молекулярной массы фермент наносили на колонку с сефадексом G-150 вместе с маркерными белками: каталазой ($M_r=200$ кДа), бычьим сывороточным альбумином ($M_r=68$ кДа), интерфероном ($M_r=22$ кДа), цитохромом С ($M_r=13$ кДа) и инсулином ($M_r=6$ кДа). На основе полученных данных строили калибровочную прямую зависимости $\lg M_r$ маркерных белков от объемов выхода (V_e), по которой и была определена кажущаяся молекулярная масса глюкоамилазы, равная 99,8 кДа, что вполне согласуется с данными литературы [1, 5, 6].

Проведенный электрофоретический анализ в ПААГ показал гомогенность полученного препарата глюкоамилазы из *S. cerevisiae* ЛВ-7.

Литература

1. Галич И.П. Амилаза микроорганизмов. Киев.: Наук. думка. 1987. 192 с.
2. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир. 1982. Т. 1. 389 с.
3. Землянухин А.А. Большой практикум по физиологии и биохимии растений. Учеб. пособие. Воронеж: Изд-во Воронежск. ун-та. 1996. 188 с.
4. Калашников Е.Я. Производство амилоли-

тических и протеолитических ферментов и применение их в пивоваренной промышленности. М.: ГосИНТИ. 1959. 24 с.

5. Квеситадзе Г.И. Грибные и бактериальные амилазы. Тбилиси.: Мецниереба. 1984. 154 с.

6. Котова Г.А., Котов В.Б., Сорокина А.С. Глюкоамилаза микроорганизмов. М.: Пищепромиздат. 1975. 41 с.

7. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высш. шк. 1980. 272 с.

8. Нестеренко М.В., Кузавлев В.А., Мосолов В.В. // Прикл. биохим. и микробиол. 1990. Т. 26. Вып. 5. С. 598.

9. Савельев А.Н., Яковлева М.Ф., Фирсов Л.Н. // Биохимия. 1984. Т. 49. Вып. 11. С. 1754.

10. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. М.: Высш. шк. 1996. 335 с.

11. Ташмухамедова Ш.С., Хасанов Х.Т., Рахимов М.М. // Прикл. биохим. и микробиол. 1995. Т. 31. Вып. 3. С. 272.ё

12. Яровенко В.В. Концентрирование ферментных растворов методом ультрафильтрации. М.: ОНТИТЭИ Микробиопром. 1978. 36 с.

13. Fogarty W.M., Bourke E.J. // J. Chem. Tech. and Biotechnol. 1983. Vol. 338. P. 145.

14. Nesterenko M.V., Tilley M., Upton S.J. // J. Biochem. Biol. 1994. Vol. 28. P. 239.

15. Pazur J.H., Lui B., Bishel F. // Biotechnol. and Appl. Biochem. 1990. Vol. 12. № 1. P. 63.

Investigation of extraction and purification from *Saccharomyces cerevisiae* LV-7 glucoamylase

Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Kozhokina O.M., Tonsheva N.V.

The developed method of extraction and purification of the enzyme including the ultrafiltration of samples on the membrane UFM-50, the isopropanol precipitation and the gel-chromatography on Sephadexes G-25 and G-150 allows to obtain the homogeneous preparation of glucoamylase from *Saccharomyces cerevisiae* LV-7 with 70-fold purity. The molecular mass of the enzyme is 99,8 kDa.