

УДК 579.22

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛИПАЗЫ, ЭКСПРЕССИРОВАННОЙ В *ESCHERICHIA COLI*

¹Кригер А.В., ²Дышлюк Л.С., ²Долганюк В.Ф., ²Зими́на М.И., ²Асякина Л.К.

¹ГНУ СибНИИС Россельхозакадемии, Барнаул, e-mail: olgakruger58@mail.ru;

²ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности», Кемерово, e-mail: soldatovals1984@mail.ru

Получен очищенный препарат рекомбинантной липазы *Thermosyntrophalipolytica* с величиной гидролитической активности 280000 Ед/г, степень очистки белка 85%. Изучены физико-химические свойства рекомбинантного белка. Установлено, что значение изоэлектрической точки для рекомбинантной липазы находится в интервале рI 3,7 ± 0,1 ед. Молекулярная масса фермента, определенная гель-фильтрацией на сефадексе G-150, составляет 14520 ± 20 Да. По результатам электрофореза получена величина молекулярной массы 14500 ± 10 Да. Определены оптимальные условия функционирования рекомбинантного фермента: рН 8,0 и температура 80°C. Показана высокая термостабильность рекомбинантной липазы: при температуре 70°C фермент сохраняет 100% активности в течение 180 мин. При температуре 80°C наблюдается сохранение 53,5% гидролитической активности липазы в течение 120 мин, при 90°C теряется 64% активности фермента в течение 60 мин.

Ключевые слова: рекомбинантная липаза, фермент, экспрессия, очистка, хроматография, изоэлектрическая точка, гидролитическая активность, молекулярная масса, рН-оптимум, температурный оптимум, термостабильность

ALLOCATION, CLEANING AND STUDYING OF PROPERTIES OF THE RECOMBINANT LIPASE, EXPRESSED IN *ESCHERICHIA COLI*

¹Kruger A.V., ²Dyshlyuk L.S., ²Dolganyuk V.F., ²Zimina M.I., ²Asyakina L.K.

¹State Scientific institution «Siberian Research Institute of Cheesemaking»

of the Russian Academy of Agricultural Sciences, Barnaul, e-mail: olgakruger58@mail.ru;

²Kemerovo Institute of Food Science and Technology, Kemerovo, e-mail: soldatovals1984@mail.ru

The cleared preparation of recombinant lipase of *Thermosyntrophalipolytica* with hydrolytic activity of 280000 Units/g, extent of purification of protein of 85% is received. Physical and chemical properties of recombinant protein are studied. It is established that value of an isoelectric point for a recombinant lipase is in an interval of pI 3,7 ± 0,1 of unit. The molecular mass of the enzyme, defined gel filtration on sephadex G-150, makes 14520 ± 20 Da. By results of an electrophoresis the size of molecular weight 14500 ± 10 Da is received. Optimum operating conditions of recombinant enzyme are defined: pH 8,0 and temperature is 80°C. High heat stability of a recombinant lipase is shown: at a temperature of 70°C enzyme keeps 100% of activity within 180 min. At a temperature of 80°C preservation of 53,5% of hydrolytic activity of a lipase within 120 min is observed, at 90°C 64% of activity of enzyme within 60 min are lost.

Keywords: recombinant lipase, enzyme, expression, cleaning, chromatography, isoelectric point, hydrolytic activity, molecular weight, pH-optimium, temperature optimium, thermal stability

В последние годы значительно возрос удельный вес пищевых продуктов, вырабатываемых с добавлением ферментов или ферментных препаратов. Использование ферментов в технологии продуктов питания способствует повышению их качества, сокращает сроки производства, в ряде случаев повышает выход готовой продукции и облегчает контроль желаемых биохимических процессов [1]. Наряду с прочно вошедшими в практику микробными, растительными и животными протеазами, амилазами, пектиназами широкое применение находят ферменты липолитического действия [2].

В частности, в последнее время возрос интерес к одному из важнейших гидролитических ферментов – липазе. Перспективы практического применения липаз делают целесообразным исследование таких свойств липазы, как субстратная специфичность, оптимальные условия действия,

стабильность при изменении кислотности среды и температуры. Многочисленные исследования посвящены изучению оптимальных условий действия липаз микроорганизмов, а также свойствам липазы как ферментного белка [2].

Фермент липаза-триглицеридгидролаза (КФ 3.1.1.3) широко распространен среди грибных микроорганизмов. Известно значительное количество продуцентов липазы, относящихся к родам *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Candida*, *Yarrowia* и др., изученных в различной степени [3].

В последние годы в качестве одного из наиболее перспективных микробных продуцентов липазы рассматривают дрожжи *Yarrowialipolytica*, у которых выявлено несколько внутриклеточных и секретируемых липаз. Повышенный интерес к созданию высокоэффективных продуцентов липаз на основе *Yarrowialipolytica* связан также

с достаточно хорошей генетической изученностью этого объекта и тем, что данный вид дрожжей удобен для промышленной ферментации.

Известен дикий штамм *Yarrowialipolytica* W29 (ATCC 20460), на основе которого получен ряд штаммов реципиентов, в том числе *Yarrowialipolytica* Pold (CLIB 139) и *Yarrowialipolytica* Polf (ATCC MYA-2613), широко используемых для конструирования продуцентов секретируемых белков [4].

В патенте РФ № 2355754 описан рекомбинантный штамм дрожжей *Yarrowialipolytica* ВКПМУ-3260 – продуцент липазы, сконструированный путем трансформации штамма *Yarrowialipolytica* Polf (ATCC MYA-2613) интегративной плазмидой pZ-ura3d4-hp4d-LIP2.

Однако описанные штаммы *Yarrowialipolytica* W29, Pold, Polf и ВКПМУ-3260 имеют низкий уровень продукции липазы.

Перспективным штаммом-продуцентом ферментов липолитического действия является термоалкалофильная анаэробная бактерия *Thermosyntrophalipolytica*. Особенностью *T. lipolytica* является способность расщеплять триглицериды и утилизировать жирные кислоты при росте в синтрофном симбиотическом сообществе с метаногенной археей (род *Methanobacterium*). В природе синтрофный метаболизм является важной промежуточной стадией в анаэробной конверсии биополимеров, таких как полисахариды, белки и липиды до углекислого газа и метана [5]. Синтрофный рост на липидах обеспечивается за счет липаз, секретируемых из клетки в окружающую среду [6]. При росте в отсутствие синтрофного партнера липазы также синтезируются и секретируются из клетки, однако в этих условиях *T. lipolytica* не способна использовать жирные кислоты и, следовательно, расти на липидах.

В работе [7] показано, что геном термоалкалофильной бактерии *T. lipolytica* кодирует набор гидролитических ферментов, которые могут секретироваться из клетки в окружающую среду. Идентифицированные протеазы различных типов и липазы обеспечивают использование *T. lipolytica* белковых субстратов и липидов соответственно.

В РФ применение липаз в пищевой промышленности сдерживается отсутствием достаточного количества эффективных продуцентов, поскольку для каждого технологического процесса необходимо иметь липазы с определенными свойствами.

Цель работы – выделение, очистка и изучение свойств рекомбинантной липазы *Thermosyntrophalipolytica*, экспрессированной в клетках *Escherichiacoli*.

Материалы и методы исследований

Объектом исследования являлась рекомбинантная липаза, продуцированная клетками *Escherichiacoli*. На предварительном этапе исследования проводили выделение гена липазы из штамма *Thermosyntrophalipolytica*, клонирование гена, кодирующего липазу, создание системы устойчивой экспрессии гена в *Escherichiacoli*, наработку биомассы.

Для выделения фермента использовали метод осаждения серноокислым аммонием: раствор после добавления соли выдерживали в течение 16 ч при 4°C. Сформировавшийся осадок отделяли сепарированием, растворяли в минимальном объеме 0,005 М фосфатного буфера.

Очистку фермента осуществляли хроматографическим методом. Для этого фракцию, полученную после осаждения сульфатом аммония, пропускали через колонку с сефадексом G-150, уравновешенную фосфатно-цитратным буфером (рН 7,5) со скоростью элюции 10 мл/ч по 1 мл.

Для определения изоэлектрической точки рекомбинантной липазы методом изоэлектрического фокусирования использовали очищенный препарат, исследование проводили при градиенте рН от 4,0 до 8,0, создаваемого амфолитом с пределом рН в указанном диапазоне.

Молекулярную массу рекомбинантной липазы определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли и с применением гель-хроматографического метода на сефадексе G-150.

Гидролитическую активность рекомбинантной липазы определяли модифицированным методом Yamada и Machida, в котором в качестве субстрата использовали эмульсию оливкового масла. Реакционная смесь состояла из 5 мл эмульсии оливкового масла в 2%-м растворе поливинилового спирта и 4 мл фосфатно-цитратного буфера (рН 7,0) и 1 мл раствора фермента. Липолиз проводили в стационарных условиях в течение часа при оптимальной температуре. Реакцию останавливали добавлением 30 мл этанола, продукты гидролиза титровали 0,05 М раствором NaOH в присутствии 1%-го спиртового раствора фенолфталеина. За единицу липазной активности принимали такое количество фермента, которое отщепляет 1 мкмоль олеиновой кислоты от 40%-й эмульсии оливкового масла за 1 час при оптимальной температуре. Содержание белка определяли по методу Лоури.

Для выяснения оптимального значения рН субстрата, при котором гидролиз происходит наиболее активно, проверяли диапазон рН от 4,0 до 9,0 на субстрате – эмульсии оливкового масла с поливиниловым спиртом. Величину рН субстрата устанавливали фосфатно-цитратным буфером. Гидролиз проводился на протяжении 30 мин.

При исследовании температурного оптимума липазы исследовали ее термостабильность. Для этого раствор фермента (1:1000) выдерживали при различных температурах в диапазоне от 60 до 100°C в течение 30–180 мин, после чего определяли активность липазы.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе хроматографической очистки получен препарат рекомбинантной липазы с гидролитической активностью

280000 Ед/г, массовая доля белка равна 32,0%. Степень очистки ферментного препарата составила 85%.

Изучали такие физико-химические свойства рекомбинантной липазы, как изоэлектрическая точка, молекулярная масса, влияние рН и температуры на стабильность фермента, термостабильность.

Результаты определения изоэлектрической точки фермента представлены на

рис. 1, из которого следует, что значение изоэлектрической точки для рекомбинантной липазы находится в интервале рI $3,7 \pm 0,1$ ед. Следует отметить, что пик активности фермента фактически совпадает с пиком выхода белка, иными словами, наблюдается один белковый пик в широком интервале рН, что является признаком высокой степени чистоты исследуемого препарата.

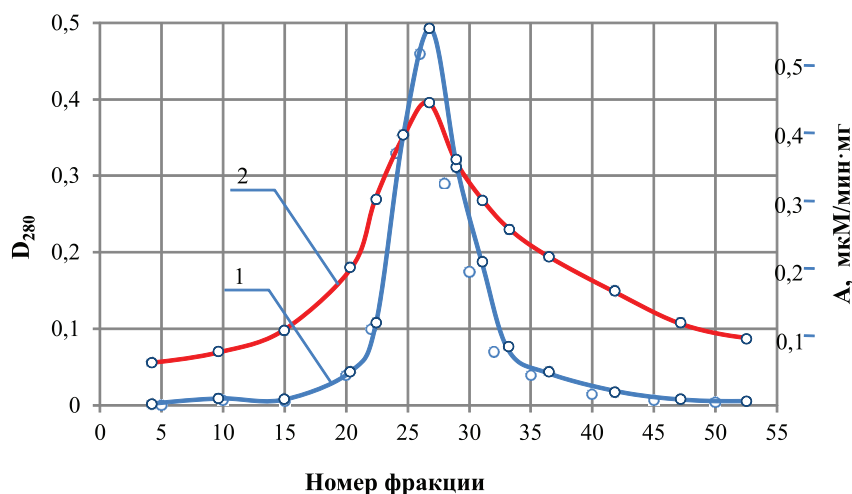


Рис. 1. Определение изоэлектрической точки липазы в градиенте рН от 4,0 до 8,0: 1 – удельная активность, мкМ/мин·мг; 2 – оптическая плотность при 280 нм, D_{280}

Молекулярная масса рекомбинантной липазы, определенная гель-фильтрацией на сефадексе G-150, находится в пределах 14520 ± 20 Да (рис. 2). Исследования молекулярной массы методом электрофореза в полиакриламидном геле показали, что она равна 14500 ± 10 Да (рис. 3).

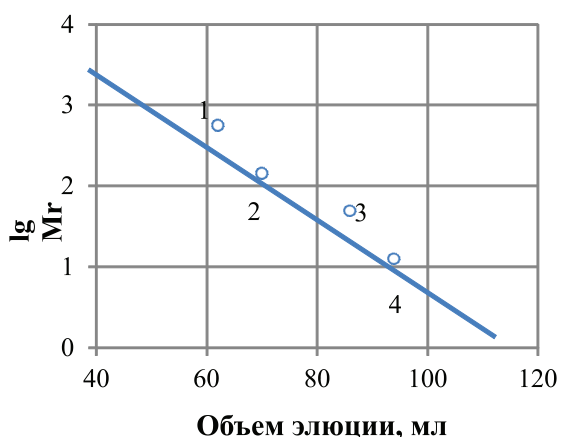


Рис. 2. Определение молекулярной массы липазы гель-хроматографическим методом на сефадексе G-150. Маркерные белки:

- 1 – ферритин (450 кДа);
- 2 – альдолаза (160 кДа);
- 3 – яичный альбумин (45 кДа);
- 4 – цитохром С (12,5 кДа)

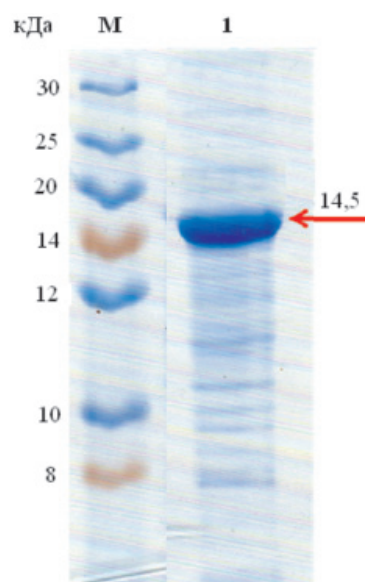


Рис. 3. Определение молекулярной массы липазы методом электрофореза в полиакриламидном геле:

- M – маркер PageRuler (Bio-Rad, США), диапазон молекулярных масс от 8 до 30 кДа;
- 1 – рекомбинантная липаза

Наибольший интерес представляет изучение таких свойств рекомбинантного фермента, как оптимальные условия

функционирования: температура и рН. Для определения рН-оптимума липазы проводили гидролиз эмульсии триглицеридов оливкового масла в интервале рН от 4,0 до 9,0.

На рис. 4 представлены результаты исследования зависимости величины активности липазы от концентрации ионов водорода.

Из рис. 4 следует, что рН-оптимум исследуемой липазы лежит в пределах 7,5–8,5. Следует отметить, что ветви полученной

кривой несимметричны: нисходящая ветвь характеризуется более крутым наклоном.

Как известно, зависимость активности фермента от температуры объясняется тем, что, с одной стороны, данный фактор влияет на белковую часть фермента, приводя к его денатурации и снижению уровня каталитической активности, с другой стороны, при повышении температуры возрастает скорость реакции образования фермент-субстратного комплекса.

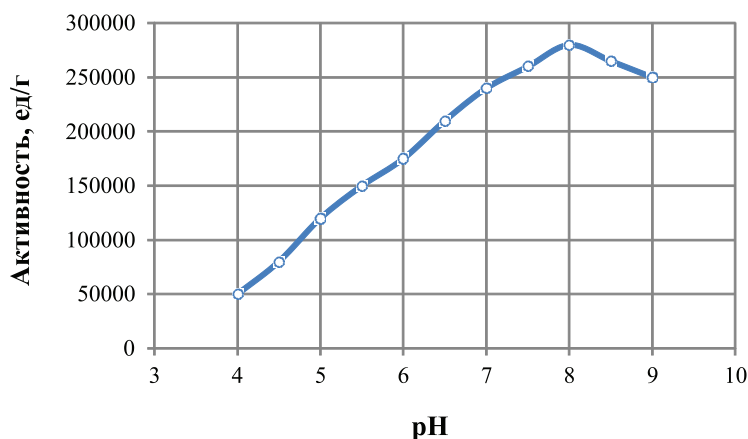


Рис. 4. Зависимости активности липазы от величины рН

На рис. 5 представлена зависимость величины активности липазы от температуры. Данные получены при оптимальном значении рН 8,0 и в температурном интервале от 60 до 100 °С. Из представленного графика видно, что зависимость активности липазы от температуры описывается колоколообразной кривой. При низкой температуре снижение активности связано с уменьшением доли активных молекул фермента, а при высокой – существенны-

ми конформационными изменениями в молекуле липазы. Наибольшая активность фермента наблюдается при температуре от 75 до 85 °С и составляет 280000 ед./г белка. Оптимальной температурой функционирования рекомбинантной липазы является 80 °С.

В таблице представлены данные, характеризующие влияние температуры и времени экспозиции на стабильность рекомбинантной липазы.

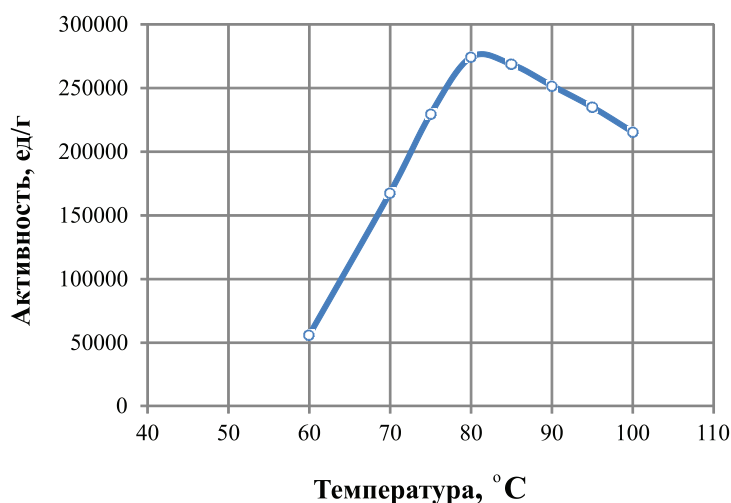


Рис. 5. Влияние температуры на активность липазы при оптимальной величине рН

Исследование термостабильности рекомбинантной липазы

Продолжительность инкубации, мин	Активность рекомбинантной липазы, Ед/г при разной температуре, °С		
	70	80	90
30	280000	275000	275000
60	280000	220000	100000
90	280000	180000	50000
120	280000	150000	35000
150	280000	145000	25000
180	280000	140000	10000

Данные таблицы свидетельствуют о высокой термостабильности рекомбинантной липазы. Так, при температуре 70°C фермент сохраняет 100% активности в течение 180 мин. При температуре 80°C наблюдается сохранение 53,5% гидролитической активности липазы в течение 120 мин, при 90°C теряется 64% активности фермента в течение 60 мин.

Выводы

Получен очищенный препарат рекомбинантной липазы *Thermosyntrophalipolytica* с величиной гидролитической активности 280000 ед./г, степень очистки белка 85%. Изучены физико-химические свойства рекомбинантного белка. Установлено, что значение изоэлектрической точки для рекомбинантной липазы находится в интервале рI 3,7 ± 0,1 ед. Молекулярная масса фермента, определенная гель-фильтрацией на сефадексе G-150, составляет 14520 ± 20 Да. По результатам электрофореза получена величина молекулярной массы 14500 ± 10 Да. Определены оптимальные условия функционирования рекомбинантного фермента: рН 8,0 и температура 80°C. Показана высокая термостабильность рекомбинантной липазы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, конкурс «мол_рф_нр», договор № НС-13-08-90724\13.

Список литературы

1. Бабич О.О. Особенности биотрансформации фенилаланина в технологии продуктов питания для больных фенилкетонурией / О.О. Бабич, И.С. Разумникова, Л.С. Солдатова // Техника и технология пищевых производств. – 2011. – № 2. – С. 103–109.
2. Ашрефи Ф.Дж. Препарат липазы *Mucor racemosus* и некоторые его свойства / Ф.Дж. Ашрефи, С.Ю. Касумова, Р.А. Агабекова // Вестник Московского государственного областного университета. Серия «Естественные науки». – 2010. – № 2. – С. 18–21.
3. Long K. Substrate preference of mycelium-bound lipase from strain of *Aspergillus flavus* / K. Long, H.M. Ghazali, A. Arif, M.Y. Che, C. Bucke // Biotechnol. Lett. – 1998. – № 4. – С. 369–372.
4. Madzak C. Heterologous protein expression and secretion in the nonconventional yeast *Yarrowialipolytica*: a review /

C. Madzak, C. Gaillardin, J.M. Beckerich // Journal of Biotechnology. – 2004. – № 109. – P. 63–81.

5. Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1997. – Vol. 61. – P. 262–280.

6. Salameh M.A. Purification and characterization of two highly thermophilic alkaline lipases from *Thermosyntrophalipolytica* / M.A. Salameh, J. Wiegel // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – Vol. 73(23). – P. 7725–7731.

7. Марданов А.В. Гидролитические ферменты, кодируемые геномом термоалкалофильной бактерии *Thermosyntrophalipolytica* / А.В. Марданов, А.В. Белецкий, Н.В. Равин // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 11 (часть 4). – С. 851–854; URL: www.rae.ru/fs/?section=content&op=show_article&article_id=9999883.

References

1. Babich O.O. Features of biotransformation of phenylalanine in technology of food for sick phenylketonuria / O.O. Babich, I.S. Razumnikova, L.S. Soldatova // Equipment and technology of food productions. 2011. no. 2. pp. 103–109.
2. Ashrefi F.D. Preparation of a lipase of *Mucor racemosus* and its some properties / F.D. Ashrefi, S.Yu. Kasumova, R.A. Agabekova // Messenger of the Moscow state regional university. Natural Sciences series. 2010. no. 2. pp. 18–21.
3. Long K. Substrate preference of mycelium-bound lipase from strain of *Aspergillus flavus* / K. Long, H.M. Ghazali, A. Arif, M.Y. Che, C. Bucke // Biotechnol. Lett. 1998. no. 4. pp. 369–372.
4. Madzak C. Heterologous protein expression and secretion in the nonconventional yeast *Yarrowialipolytica*: a review / C. Madzak, C. Gaillardin, J.M. Beckerich // Journal of Biotechnology. 2004. no. 109. pp. 63–81.
5. Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997. Vol. 61. pp. 262–280.
6. Salameh M.A. Purification and characterization of two highly thermophilic alkaline lipases from *Thermosyntrophalipolytica* / M.A. Salameh, J. Wiegel // Appl. Environ. Microbiol. 2007. Vol. 73(23). pp. 7725–7731.
7. Mardanov A.V. Hydrolytic enzymes coded by a genome of a thermoalkaliphilic bacterium of *Thermosyntrophalipolytica* / A.V. Mardanov, A.V. Beletsky, N.V. Ravin // Basic researches. 2012. no. 11 (part 4). pp. 851–854.

Рецензенты:

Ульрих Е.В., д.т.н., профессор, ФГБОУ ВПО «Кузбасский государственный технический университет им. Т.Ф. Горбачева», г. Кемерово;

Курбанова М.Г., д.т.н., заведующая кафедрой технологии хранения и переработки сельскохозяйственной продукции, ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный сельскохозяйственный институт», г. Кемерово.

Работа поступила в редакцию 30.11.2013.