

ОЧИСТКА И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ КИСЛЫХ ПРОТЕАЗ ИЗ НАТИВНОГО РАСТВОРА ЧАЙНОГО ГРИБА (*MEDUSOMYCES GISEVII LINDAU*)

Буланов М. Д.

Научный руководитель: доцент, к.ф.н. Глазова Н. В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования Санкт-Петербургский государственный химико-
фармацевтический университет,
кафедра биотехнологии
г. Санкт-Петербург

Ключевые слова: чайный гриб, нативный раствор, кислая протеаза, сорбция, пигменты.

Резюме: данная исследовательская работа посвящена изучению белкового компонентного состава нативного раствора чайного гриба (*Medusomyces Gisevii Lindau*) и очистке кислых протеаз из нативного раствора методом сорбции.

Resume: this research is devoted to the study of the protein component composition of the native solution of the kombucha (*Medusomyces Gisevii Lindau*) and the purification of acid proteases from the native solution by the sorption method.

Актуальность. Протеолитические ферменты находят широкое применение в различных отраслях промышленности, а именно пищевой, кожевенной, химической, фармацевтической. Протеолитические ферменты играют большую роль в процессах, происходящих в желудке и кишечнике человека. Поэтому протеазы, или протеолитические ферменты, используются в лекарственных препаратах, применяемых для коррекции пищеварения. В связи с этим, поиск альтернативных источников протеаз является актуальной задачей. *Medusomyces Gisevii Lindau* имеет потенциал стать одним из промышленных продуцентов кислых протеаз.

Цель. Подбор условий очистки кислых протеаз нативного раствора чайного гриба *Medusomyces Gisevii Lindau* от пигментных примесей.

Задачи.

1. Изучить белковый состав нативного раствора, отобранного в момент максимального биосинтеза кислых протеаз, используя метод гельхроматографии. С помощью откалиброванной колонки определить молекулярную массу кислой протеазы.

2. Подобрать условия отделения пигментных примесей от белков нативного раствора.

Материалы и методы. Объектом исследования является нативный раствор чайного гриба (*Medusomyces Gisevii Lindau*), полученный после культивирования при 26°C. Питательная среда состоит из 15 г глюкозы и настоя 15 г зелёного чая [1].

В работе были использованы метод Ансона для определения активности кислой протеазы, метод Лоури и метод Бредфорда для определения белка [2].

Гельхроматографию проводили на лабораторной колонке D×H = 1,0×20 см. В качестве носителя для гельхроматографии был выбран сефадекс фирмы «Sigma» марки G75 (сверхтонкий), так как на основании литературных данных было

выяснено, что исследуемые ферменты имеют молекулярную массу не более 75 кДа [3].

Для определения пигмента в нативном растворе был предварительно получен спектр и выявлен максимум поглощения для пигментных примесей.

Депигментацию проводили на макропористом сорбенте в колонне с размерами ($D \times H = 1,0 \times 12$) см. Сорбент СКН является слабым амфолитом и работает в диапазоне рН от 0 до 14 [4].

Результаты и их обсуждение. Для изучения белкового компонентного состава культуральной жидкости была проведена гельхроматография нативного раствора *Medusomyces Gisevii Lindau*. Гельхроматография проводилась в пробах, отобранных на 4 сутки культивирования (период максимального биосинтеза протеазы). Предварительно была измерена общая концентрация белка и активность кислой протеазы в отобранной пробе. После гельхроматографического анализа во всех фракциях определялись относительная концентрация общего белка и относительная активность кислой протеазы.

Результаты представлены на рисунках 1 и 2, в виде зависимостей

$C_i/C_{исх} = f((V_i - V_0)/V_k)$ и $A_i/A_{исх} = f((V_i - V_0)/V_k)$, где C_i и $C_{исх}$ – концентрация общего белка во фракции и в исходной пробе, мг/мл; $(V_i - V_0)/V_k$ – относительный объём; V_i – объём фракции, мл; V_0 – свободный объём колонки, мл; V_k – объём колонки, мл; A_i и $A_{исх}$ – активность протеазы во фракции и в исходной пробе, ЕД/мл

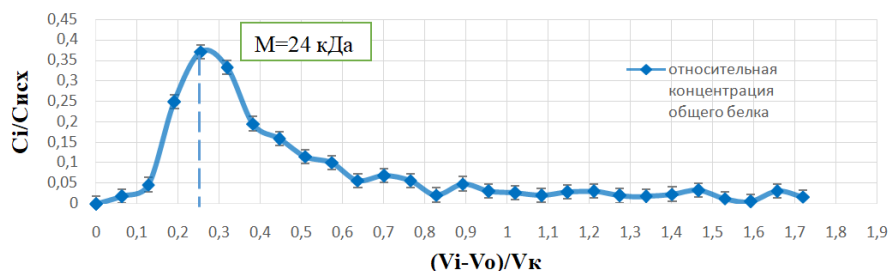


Рис. 1 – Гельхроматографический анализ нативного раствора *Medusomyces Gisevii Lindau* по относительной концентрации общего белка

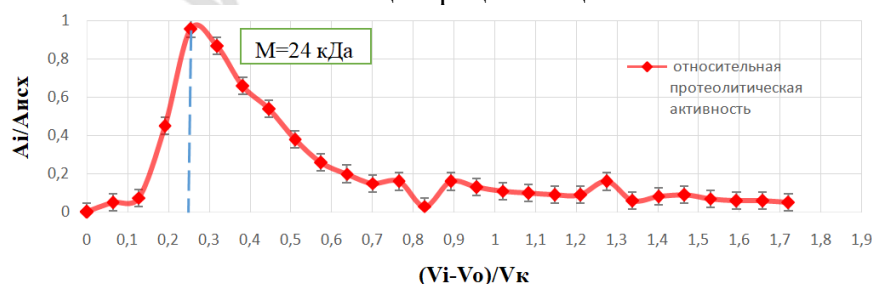


Рис. 2 – Гельхроматографический анализ нативного раствора *Medusomyces Gisevii Lindau* по относительной протеолитической активности

Как видно из данных, представленных на рисунках 1 и 2, на гельхроматограмме нативного раствора *Medusomyces Gisevii Lindau* по общему белку присутствует один ярко выраженный пик, который соответствует молекулярной массе 24 кДа. В белковом компонентном составе нативного раствора *Medusomyces Gisevii Lindau* присутствует значительное количество низкомолекулярных примесей белковой природы. Пик по белку совпадает с пиком по протеолитической активности. Следовательно, в составе нативного раствора, полученного на 4 сутки

культивирования, присутствует только кислая протеаза и низкомолекулярные пептиды, по всей видимости, получившиеся в результате разложения белков раствора.

Очистка нативного раствора чайного гриба от пигментных примесей проводилась в динамических условиях с использованием сорбционного метода. В качестве сорбента для депигментации был выбран гемосорбент СКН. Выбор этого сорбента был обоснован тем, что в результате предварительных испытаний результаты очистки на нём были наиболее высокими[15]. Перед проведением депигментации в нативном растворе определяли исходную общую концентрацию белка $C_{исх}$ и содержание пигментов исходном растворе $D_{исх}$. Содержание пигментов находили, измеряя оптическую плотность пробы на спектрофотометре при длине волны $\lambda_{max}=365$ нм. Чем выше оптическая плотность раствора, тем больше содержание в нём пигментов.

Результаты сорбции пигментов и белков на СКН представлены на рисунке 193, где D – оптическая плотность пробы, D_0 – оптическая плотность исходного раствора, C – концентрация белка в пробе, C_0 – концентрация белка в исходном растворе, $(V_i - V_0)/V_k$ – относительный объём.

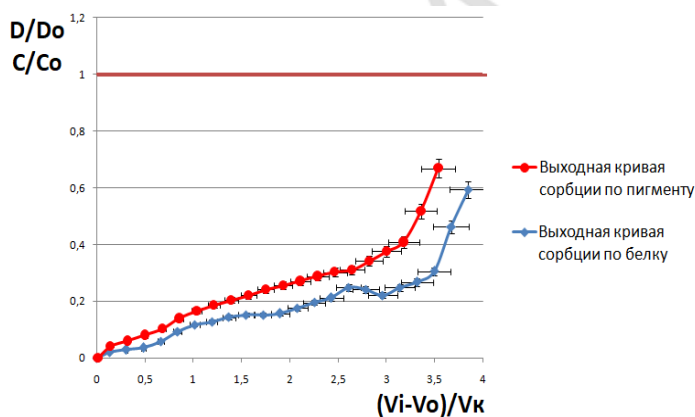


Рис. 3 - Выходные кривые сорбции по белку и по пигменту.

Результаты десорбции пигмента и белка представлены на рисунке 4, где D – оптическая плотность пробы, D_0 – оптическая плотность исходного раствора, C – концентрация белка в пробе, C_0 – концентрация белка в исходном растворе, $(V_i - V_0)/V_k$ – относительный объём.

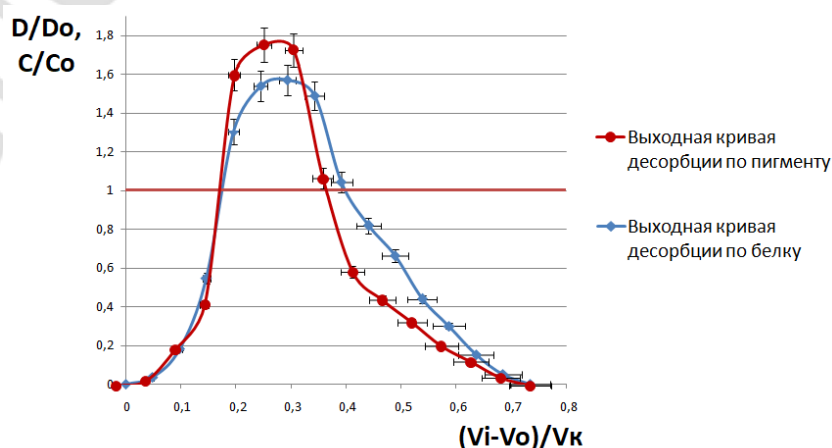


Рис. 4 - Выходные кривые десорбции по белку и по пигменту.

Выходные кривые по белку и по пигменту практически идентичны. Соотношение площадей S_1/S_2 составляет 90%. То есть они практически совпадают. Из этого можно сделать вывод о том, что протеазы нативного раствора чайного гриба находятся в комплексе с пигментами и не могут быть очищены от них методом сорбции.

Кафедра биотехнологии ведёт сотрудничество с компанией Kombucha Hill. Промышленные растворы, предоставленные в рамках этого сотрудничества, были подвергнуты депигментации в динамических условиях на СКН.

Результаты сорбции и десорбции пигментов и белков из промышленных растворов компании представлены на рисунках 5-8, где D и D_0 – оптическая плотность пробы и исходного раствора соответственно, C и C_0 – концентрация белка в пробе и исходном растворе соответственно, $(V_i - V_0)/V_k$ – относительный объём.

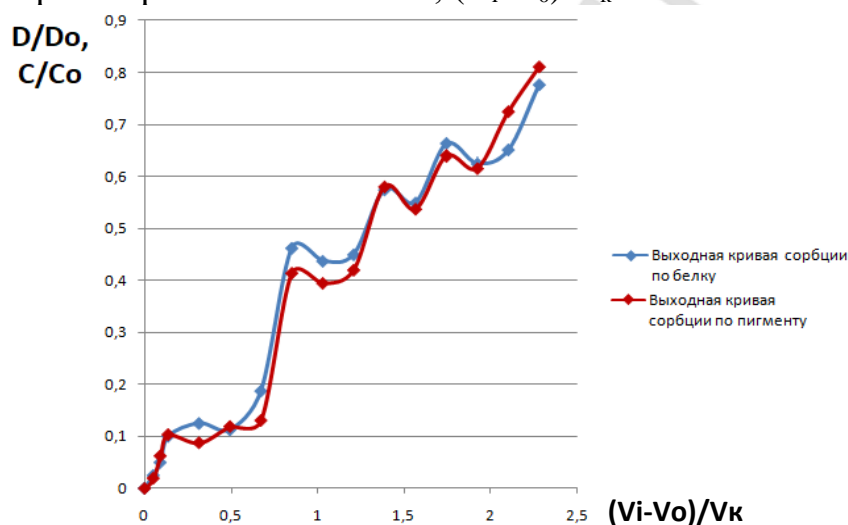


Рис. 5 - Выходные кривые сорбции по белку и по пигменту (гибискус).

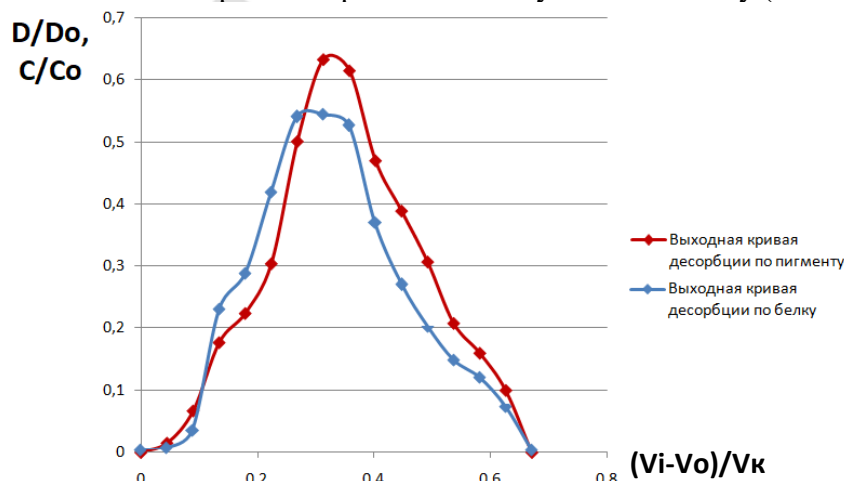


Рис. 6 - Выходные кривые десорбции по белку и по пигменту (гибискус).

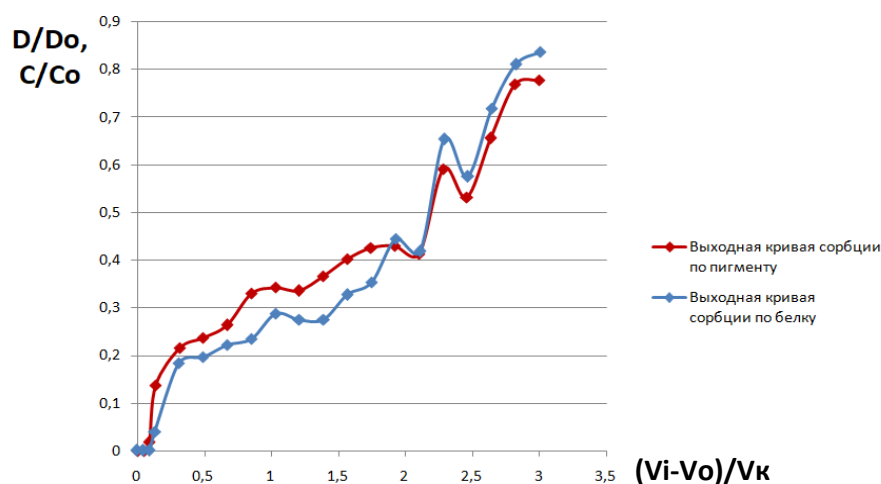


Рис. 7 – Выходные кривые сорбции по белку и по пигменту (чабрец и саган-дайль).

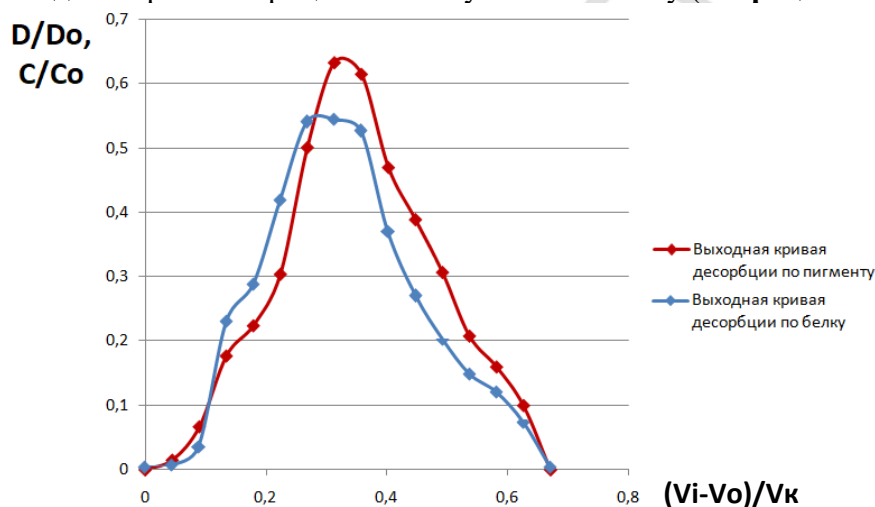


Рис. 8 – Выходные кривые десорбции по белку и по пигменту (чабрец и саган-дайль).

Выходные кривые по белку и по пигменту обоих напитков практически идентичны. Соотношение площадей S_3/S_4 и S_5/S_6 составляет около 100%. Протеазы нативного раствора чайного гриба находятся в комплексе с пигментами точно также, как и в эксперименте с чайным грибом на кафедре. Из этого можно сделать вывод о том, что чайный гриб *Medusomyces Gisevii Lindau* осуществляет синтез кислых протеаз исключительно в комплексе с пигментом. Прочность этого комплекса не зависит от состава питательной среды.

Выводы:

1. При максимальном биосинтезе кислой протеазы в культуральной жидкости чайного гриба инактивируются остальные ферменты (амилаза, липаза). Это связано с тем, что протеаза способна расщеплять все вещества белковой природы до низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот.
2. Протеазы нативного раствора чайного гриба не могут быть очищены от пигментов чая. Это связано с тем, что ферменты находятся в комплексе с пигментами
3. Независимо от состава питательной среды и природы пигментов, протеазы, синтезирующиеся чайным грибом, находятся в комплексе с пигментами культуральной жидкости. Вероятнее всего, пигменты в составе кислых протеаз стабилизируют активный центр ферментов.

Литература

1. Лунева Н. М. Белковый состав нативного раствора чайного гриба (*Medusomyces Gisevi Lindau*) / Лунева Н.М., Серкова А.Н. // Сборник материалов VI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО», Санкт-Петербург, 25–26 апреля 2016 г. – СПб.: Изд-во СПХФА, 2016. – 254 с
2. Фармакопедия.рф. ОФС.1.2.3.0012.15 Определение белка [Электронный ресурс]. URL – <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-3-0012-15-opredelenie-belka/> (дата обращения: 26.02.2018).
3. М.А. Климова, А.Т. Епринцев Очистка ферментов и методов исследования их каталитических свойств: учебно-методическое пособие для вузов (Практикум). Воронеж: Изд-во Воронежского государственного университета, 2008. 35 с.
4. Салдадзе, К.М. Ионообменные высокомолекулярные соединения. – М.: Госхимиздат, 1998. – 232 с.