

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 582.287.238:608.2

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-467-471>

Поступила в редакцию 14.11.2018

Received 14.11.2018

В. В. Сакович, А. М. Груша, В. В. Ревенко, Д. Д. Жерносеков

Полесский государственный университет, Пинск, Республика Беларусь

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ОЧИСТКА ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ *PLEUROTUS OSTREATUS*

Аннотация. Проведена первичная очистка ферментного препарата, обладающего протеолитической активностью, из культуральной жидкости *Pleurotus ostreatus*. Использованы методы осаждения, диализа, ионообменной хроматографии на DEAE- и КМ-сефарозе. Установлено, что в результате хроматографии на КМ-сефарозе ферментный препарат из культуральной жидкости разделяется на три фракции, одна из которых обладает молокосвертывающей активностью (МСА). Хроматография на DEAE-сефарозе позволила значительно очистить фермент, обладающий МСА.

Ключевые слова: базидиомицеты, протеолитические ферменты, молокосвертывающая активность, бэтч-метод, ионообменники

Для цитирования: Хроматографическая очистка ферментного препарата из культуральной жидкости *Pleurotus ostreatus* / В. В. Сакович [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 467–471. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-467-471>

V. V. Sakovich, A. M. Hrusha, V. V. Revenko, D. D. Zhernossekov

Polesky State University, Pinsk, Republic of Belarus

CHROMATOGRAPHIC PURIFICATION OF THE ENZYME PREPARATION FROM THE CULTURAL LIQUID OF *PLEUROTUS OSTREATUS*

Abstract. The primary purification of the proteolytic enzyme preparation from the *Pleurotus ostreatus* culture fluid was carried out. Methods of salting out, dialysis, ion-exchange chromatography on DEAE- and KM-sepharose were used. It was shown that during the chromatography on KM-sepharose, the enzyme preparation from the culture liquid was divided into three fractions, one of which possessed milk-clotting activity (MCA). Chromatography on DEAE-sepharose allowed us to reach the significant purity of the enzyme with MCA.

Keywords: basidiomycetes, proteolytic enzymes, milk-clotting activity, batch method, ion exchanger

For citation: Sakovich V. V., Hrusha A. M., Revenko V. V., Zhernossekov D. D. Chromatographic purification of the enzyme preparation from the cultural liquid of *Pleurotus ostreatus*. *Vesti Natsyional'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 4, pp. 467–471 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-4-467-471>

Введение. Протеолитические ферменты широко используются в молочной промышленности (сыроделии) в качестве сычужных ферментных препаратов. Основным источником получения данных энзимов служат сычуги – отделы желудков телят и ягнят. Однако ввиду ограниченности данного ресурса необходим поиск альтернативных источников получения протеолитических ферментов [1].

Одними из перспективных продуцентов являются базидиальные грибы. Известно, что *Pleurotus ostreatus* содержит протеиназы, обладающие молокосвертывающей активностью (МСА) [2]. В литературе имеются данные, что экстракт плодовых тел *P. ostreatus* имеет сходство с препаратами, используемыми в молочной промышленности, поэтому после проведения очистки он может быть применен в сыроделии [3–6]. Нами подобраны питательные среды и оптимальные условия для глубинного культивирования *P. ostreatus* [7], а кроме того, показано, что *P. ostreatus* обладает МСА [8].

Начальный этап очистки ферментов, обладающих МСА, включал осаждение ферментов солями: хлоридом натрия и сульфатом аммония. Наилучший результат дало полное насыщение раствора хлоридом натрия в течение 12 ч при температуре 4 °С, рН 4,7, и перемешивании при скорости

60 об/мин. Также экспериментально подобраны условия для последующего диализа полученного препарата: температура 4 °С, перемешивание в течение 20 ч при скорости 60 об/мин [9].

Цель работы – хроматографическая очистка ферментного препарата из культуральной жидкости *P. ostreatus*.

Для достижения цели необходимо было решить ряд задач:

1. Проведение катионообменной хроматографии.
2. Проведение анионообменной хроматографии.
3. Проведение бэтч-метода.
4. Определение содержания белка, уровней МСА и общей протеолитической активности на каждом этапе очистки.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на диком штамме *P. ostreatus*, который был выделен из плодовых тел, растущих на культурном тополе (*Populus* sp.). В ходе исследований использовали картофельно-сахарозную среду. Инокулом вводили в виде фрагментов маточника мицелия площадью 1 см². Культивировали в течение 14 дней в темноте при температуре 27 °С на шейкере WiseShakeSHO при скорости 70 об/мин. По окончании инкубации производили отбор и замораживание культуральной жидкости, не подвергая ее дополнительному разведению.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, предполагая, что концентрация белка 1 мг/мл соответствует $A_{280} = 1$ опт. ед. в кювете толщиной 1 см [10].

МСА определяли по общепринятой методике: пробирку с субстратом (объемом 10 мл молока), содержащим 0,0015 М раствор CaCl₂, нагревали до 35 °С и вносили 2 мл исследуемого ферментного препарата. Активность препарата оценивали по времени образования плотного молочного сгустка. За единицу МСА принимали количество фермента, которое сворачивает 100 мл молока за 40 мин при 35 °С [11].

Общую протеолитическую активность (ПА) определяли по лизису желатина в тонком слое агарового геля [12]. Объем образца, наносимого на белок-агаровые пластины, составлял 10 мкл. Активность препарата рассчитывали, измеряя площадь белок-агаровых пластин с гидролизованым субстратом вокруг каждой лунки. За единицу активности (Е) фермента принимали тот уровень активности, который обуславливает гидролиз субстрата на участке геля размером 1 см².

Для получения сычужных ферментов из культуральной жидкости применяли метод высаливания с использованием разных солей: сульфата аммония и хлорида натрия. Для удаления соли применяли метод диализа.

Для длительного хранения препарата использовали метод лиофильной сушки при сочетании температуры –51 °С и давления 137 Па.

Катионообменную хроматографию проводили на колонке (1,5 × 3) с КМ-сефарозой (Bio-Rad, США), уравновешенной 0,2 М ацетатным буфером (рН 5,0). Элюцию проводили со скоростью 10 мл/ч, используя ступенчатый градиент со следующими концентрациями NaCl: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 М.

Анионообменную хроматографию проводили на колонке (1,5 × 3) с DEAE-сефарозой (Bio-Rad, США), уравновешенной 0,2 М ацетатным буфером (рН 5,0). Элюцию проводили со скоростью 10 мл/ч, используя ступенчатый градиент со следующими концентрациями NaCl: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 М.

Бэтч-метод проводили следующим образом. DEAE-сефарозу уравновешивали 0,2 М ацетатным буфером (рН 5,0), смешивали с раствором лиофильного препарата, учитывая количество белка, который способен связывать данный анионообменник. Смесь инкубировали в течение 30 мин при температуре 4 °С. Затем суспензию центрифугировали при скорости

Т а б л и ц а 1. Начальные этапы очистки молокосвертывающих ферментов *P. ostreatus*

Т а б л е 1. Initial stages of purification of milk-clotting enzymes *P. ostreatus*

Фракция	Объем фракции, мл	Содержание белка, мг/мл	МСА, ед/мл			Степень очистки
			во фракции	общая	удельная	
Культуральная жидкость	200	0,185	5	1000	27	1
Осаждение хлоридом натрия	50	0,22	5	250	22,7	0,84
Раствор лиофильного порошка	5	1,07	33	165	30,8	1,14

12000 об/мин при температуре 4 °С в течение 10 мин. В надосадочной жидкости определяли концентрацию белка и уровень МСА. Для определения остаточной МСА процедуру повторяли с буфером, содержащим 0,1; 0,25; 1 М NaCl.

Результаты и их обсуждение. Первый этап очистки культуральной жидкости позволил сохранить практически всю исходную МСА (табл. 1).

Часть лиофильного порошка использовали для дальнейшей очистки препарата, содержащего МСА и ПА на ионообменниках (КМ-и ДЭАЭ-сефарозе).

Хроматография на КМ-сефарозе показала, что ПА исходного препарата представлена тремя фракциями:

ферментами, которые элюируются с колонки буфером без добавления соли;

ферментами, которые элюируются с колонки буфером, содержащим от 0,1 до 0,25 М NaCl;

ферментами, которые элюируются с колонки буфером, содержащим от 0,1 до 0,75 М NaCl (табл. 2).

Таким образом, произошло частичное разделение молокосвертывающей и общей ПА препарата.

Данный метод можно рекомендовать для дальнейших более детальных исследований свойств протеолитических ферментов, входящих в исходный препарат, например, субстратной специфичности.

При хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе фермент, обладающий МСА, не связывается с носителем, при этом достигается его очистка в 22,7 раза. Это обусловлено тем, что большинство белков (более 50 % от общего количества белка, наносимого на колонку) связывается с анионообменником. Кроме того, в процессе хроматографического разделения происходит автоактивация ферментов или фермента, обладающего МСА. Данное явление обнаружено ранее для ферментного препарата, содержащего МСА из плодовых тел *P. ostreatus* [6]. Как видно из табл. 3, при данном виде хроматографии МСА и общая ПА не разделяются.

Так как данный метод можно рекомендовать для использования в молочной промышленности (сыроделии) на этапе получения сырного сгустка, целесообразно предложить использование бэтч-метода при очистке на DEAE-сефарозе. Результаты очистки бэтч-методом приведены в табл. 4.

В результате применения такого метода достигнута степень очистки в 21 раз. При этом значительно экономится время проведения эксперимента, что является важным при использовании данного метода в промышленности. В качестве носителя можно рекомендовать недорогие анионообменники, например DEAE-целлюлозу.

Таблица 2. Очистка ферментного препарата на КМ-сефарозе

Table 2. Purification of the enzyme preparation on KM-sepharose

Фракция	Объем фракции, мл	Содержание белка, мг/мл	МСА, ед/мл			Степень очистки
			во фракции	общая	удельная	
Раствор лиофильного порошка	10	1,07	33	165	30,8	1,14
МСА: объединенная фракция	20	0,15	90	900	300	11
ПА: фракция 1	20	0,15	16,9	338	113	2,7
ПА: фракция 2	10	0,16	15,7	157	98	2,3
ПА: фракция 3	10	0,07	20	200	285,7	6,8

Таблица 3. Очистка ферментного препарата на DEAE-сефарозе

Table 3. Purification of the enzyme preparation on DEAE-sepharosa

Фракция	Объем фракции, мл	Содержание белка, мг/мл	Активность, ед/мл			Степень очистки
			во фракции	общая	удельная	
Раствор лиофильного порошка	5	1,07	33	165	30,8	1
МСА: объединенная фракция	8	0,13	92,5	740	698	22,7
ПА: объединенная фракция	8	0,13	24,31	194,5	183,5	5,2

Таблица 4. Очистка ферментного препарата на DEAE-сефарозе с помощью бэтч-метода

Table 4. Purification of the enzyme preparation on DEAE-sepharose using the batch method

Фракция	Объем фракции, мл	Содержание белка, мг/мл	МСА, ед/мл			Степень очистки
			во фракции	общая	удельная	
Раствор лиофильного порошка	5	1,07	33	165	30,8	1,14
Объединенная фракция	7	0,15	100	700	648	21

Заклучение. Хроматографическое разделение МСА и ПА на КМ-сефарозе можно рекомендовать для дальнейших более детальных исследований протеолитических ферментов, входящих в исходный препарат. Очистку ферментного препарата, обладающего МСА, с помощью хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе предлагаем использовать в сыроделии на этапе образования сырного сгустка. Планируется дальнейшая очистка препарата, обладающего МСА, и изучение субстратной специфичности ферментов, входящих во фракции, разделяемые с помощью хроматографии на ионообменных носителях.

Список использованных источников

1. Дьяконова, Г.В. Исследование некоторых физико-химических свойств молокосвертывающих ферментов вешенки обыкновенной : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.04 / Г.В. Дьяконова ; Юж. федер. ун-т. – Ростов н/Д, 2010. – 23 с.
2. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringaoleifera* flowers / E. V. Pontual [et al.] // *Food Chem.* – 2012. – Vol. 135, N 3. – P. 1848–1854. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.087>
3. Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease / M. Esposito [et al.] // *Food Chem.* – 2016. – Vol. 204. – P. 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.060>
4. Purification, characterization and functional role of novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus* / G. Palmieri [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 67, N 6. – P. 2754–2759. <https://doi.org/10.1128/aem.67.6.2754-2759.2001>
5. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withaniacoagulans* fruit / M. Salehi [et al.] // *Int. J. Biol. Macromolecules.* – 2017. – Vol. 98. – P. 847–854. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.034>
6. Лебедева, Г.В. Выделение и характеристика фермента сычужного действия из плодовых тел вешенки обыкновенной / Г.В. Лебедева, М.Т. Проскураков, М.А. Кожухова // *Изв. высш. учеб. заведений. Пищевая технология.* – 2008. – № 1. – С. 114–115.
7. Сакович, В.В. Подбор оптимальных питательных сред и условий глубинного культивирования на эффективность выращивания вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) / В.В. Сакович, Д.Д. Жерносеков // *Актуальні питання біологічної науки : IV Міжнар. заочна наук.-практ. конф., присв. 100-річчю від дня народження акад. П.Г. Богача, 12 квіт. 2018 р. : зб. ст. / Ніжин. держ. ун-т ; ред. кол. : М. Давіташвілі [та ін.]. – Ніжин, 2018. – С. 88–89.*
8. Сакович, В.В. Влияние экстракта мицелия и культуральной жидкости вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) на формировании сырного сгустка / В.В. Сакович, О.Н. Жук // *Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси : материалы XI Междунар. молод. науч.-практ. конф., Пинск, 7 апр. 2017 г. : в 2 ч. / Полес. гос. ун-т ; ред. кол. : К.К. Шебеко (гл. ред.) [и др.]. – Пинск, 2017. – Ч. 1. – С. 340–342.*
9. Сакович, В.В. Разработка методов очистки фермента, обладающего молокосвертывающей активностью из *Pleurotus ostreatus* / В.В. Сакович, А.М. Груша, Д.Д. Жерносеков // *Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии : материалы II Белорус. биохим. конгресса (г. Гродно, 17–18 мая 2018 г.) / ред. : И.Н. Семененя, А.Г. Мойсеенок. – Минск, 2018. – С. 507–511.*
10. Секретируемая металлопротеиназа *Bacillus intermedius*: получение гомогенного препарата фермента и исследование физико-химических свойств / Н.Л. Рудакова [и др.] // *Уч. зап. Казан. гос. ун-та. Сер. Естеств. науки.* – 2010. – Т. 152, № 2. – С. 145–154.
11. ГОСТ ISO 11815-2015. Молоко. Определение общей молокосвертывающей активности говяжьего сычужного фермента. – М. : Стандартформ, 2015. – 10 с.
12. Никандров, В.Н. Методы исследования протеолиза. / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова // *Современные проблемы биохимии : методы исследований / Е.В. Барковский [и др.] ; под ред. А.А. Чиркина. – Минск, 2013. – Гл. 5. – С. 132–157.*

References

1. Diakonova G. V. *Investigation of some physical and chemical properties of milk-clotting enzymes of common oyster mushroom.* Abstract of Ph. D. diss. Rostov na Donu, 2010. 23 p. (in Russian).
2. Pontual E. V., Carvalho B. E. A., Bezerra R. S., Coelho L. C. B. B., Napoleão T. H., Paiva P. M. G. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringaoleifera* flowers. *Food Chemistry*, 2012, vol. 135, no. 3, pp. 1848–1854. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.087>
3. Esposito M., di Pierro P., Dejonghe W., Mariniello L., Porta R. Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. *Food Chemistry*, 2016, vol. 204, pp. 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.060>
4. Palmieri G., Bianco C., Cennamo G., Giardina P., Marino G., Monti M., Sannia G. Purification, characterization and functional role of novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, vol. 67, no. 6, pp. 2754–2759. <https://doi.org/10.1128/aem.67.6.2754-2759.2001>
5. Salehi M., Aghamaali M. R., Sajedi R. H., Asghari S. M., Jorjani E. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withaniacoagulans* fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, vol. 98, pp. 847–854. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.034>

6. Lebedeva G. V., Proskuryakov M. T., Kozhukhova M. A. Isolation and characterization of rennet action from the fruit bodies of oyster mushroom. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Pishchevaya tekhnologiya = Food technology*, 2008, no. 1, pp. 114–115 (in Russian).

7. Sakovich V. V., Zhernosekov D. D. Selection of optimal culture media and conditions of deep cultivation for the effectiveness of cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Aktual'ni pytannja biologichnoi nauky: IV Mizhnarodna zaochna naukovo-praktychna konferencija, prysvechana 100-richchju vid dnja narodzhennja akademika P. G. Bogacha (12 kvitnja 2018 roku, Nizhyn): zbirnyk statej* [Actual questions of biological science: IV International correspondence scientific-practical conference, dedicated to the 100th anniversary of the birth of academician P. G. Bogachy (April 12, 2018, Nizhyn): a collection of articles]. Nizhyn, 2018, pp. 88–89 (in Russian).

8. Sakovich V. V., Guk O. N. Effect of mycelium extract and common oyster culture fluid (*Pleurotus ostreatus*) on the formation of cheese clot. *Nauchnyi potentsial molodezhi – budushchemu Belarusi: materialy XI mezhdunarodnoi molodezhnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Pinsk, 7 aprelya 2017 goda). Chast' 1* [The scientific potential of young people – the future of Belarus: materials of the XI International Youth scientific and practical conference (Pinsk, April 7, 2017). Part 1]. Pinsk, 2017, pp. 340–342 (in Russian).

9. Sakovich V. V., Grusha A. M., Zhernosekov D. D. Development of methods for purification of the enzyme with milk-converting activity from *Pleurotus ostreatus*. *Sovremennyye problemy biokhimii i molekulyarnoi biologii: sbornik nauchnykh statei II Belorusskogo biokhimicheskogo kongressa (Grodno, 17–18 maya 2018 goda)* [Modern problems of biochemistry and molecular biology: a collection of scientific articles of the II Belarusian biochemical congress (Grodno, May 17–18, 2018)]. Minsk, 2018, pp. 507–511 (in Russian).

10. Rudakova N. L., Sabirova A. R., Kayumov A. R., Mardanova A. M., Balaban N. P., Sharipova M. R. Secreted metalloproteinase *Bacillus intermedius*: preparation of a homogeneous enzyme preparation and investigation of physical and chemical properties. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya Estestvennyye nauki* [Scientific notes of the Kazan University. Series Natural Sciences], 2010, vol. 152, no. 2, pp. 145–154 (in Russian).

11. GOST ISO 11815-2015. *Milk. Determination of total milk-clotting activity of bovine rennet*. Moscow, Standartinform Publ., 2015. 10 p. (in Russian).

12. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S. Research methods of proteolysis. Chapter 5. *Sovremennyye problemy biokhimii: metody issledovaniy* [Modern problems of biochemistry: research methods]. Minsk, 2013, pp. 132–157 (in Russian).

Информация об авторах

Сакович Валерия Васильевна – магистр биол. наук. Полесский государственный университет (ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, г. Пинск, Республика Беларусь). E-mail: mrs.valeryia@mail.ru

Груша Александр Михайлович – студент. Полесский государственный университет (ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, г. Пинск, Республика Беларусь). E-mail: grusha.alex.98@gmail.com

Ревенько Вадим Вячеславович – студент. Полесский государственный университет (ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, г. Пинск, Республика Беларусь). E-mail: mrs.valeryia@mail.ru

Жерносеков Дмитрий Данилович – канд. биол. наук, доцент. Полесский государственный университет (ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, г. Пинск, Республика Беларусь). E-mail: chemikdd@mail.ru

Information about the authors

Valeryia V. Sakovich – Master of biological sciences. Polesky State University (23, Dneprovskaya Flotiliya Str., 225710, Pinsk, Republic of Belarus). E-mail: mrs.valeryia@mail.ru

Aliaksandr M. Hrusha – Student. Polesky State University (23, Dneprovskaya Flotiliya Str., 225710, Pinsk, Republic of Belarus). E-mail: grusha.alex.98@gmail.com

Vadim V. Revenko – Student. Polesky State University (23, Dneprovskaya Flotiliya Str., 225710, Pinsk, Republic of Belarus). E-mail: revenko@mail.ru

Dmitri D. Zhernosekov – D. Sc. (Biol.), Assistant Professor. Polesky State University (23, Dneprovskaya Flotiliya Str., 225710, Pinsk, Republic of Belarus). E-mail: chemikdd@mail.ru