УДК 547.455.647

ВЫБОР ПРОДУЦЕНТА ВЫСОКОАКТИВНОЙ ФУКОЗИДАЗЫ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЕГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Корнеева О.С., Санина Т.В., Кирьянова С.В.

ГОУ ВПО «Воронежская государственная технологическая академия», Воронеж, e-mail: saninatv@gmail.com

Проведен скрининг микроорганизмов различных таксономических групп – продуцентов высокоактивной фукозидазы. Установлено, что наибольшую биосинтетическую активность проявлял штамм Aspergillus awamori ВКМ F-808, синтезирующий фукозидазу с активностью 28 ед/мл. Определены оптимальные условия биосинтеза фукозидазы выбранным штаммом A. awamori ВКМ F-808, что позволило повысить активность фукозидазы на 25%.

Ключевые слова: фукозидаза, фукоидан, фукоза

SELECTION OF HIGHLY ACTIVE FUCOSIDASE PRODUCER AND OPTIMIZATION OF ITS CULTIVATION

Korneeva O.S., Sanina T.V., Kiryanova S.V.

SEE HVE «Voronezh state technological academy», Voronezh, e-mail: saninatv@gmail.com

Screening of microorganisms of different taxonomic groups – producers of highly active fucosidase was made. Established that most biosynthetic activity was shown by a strain of Aspergillus awamori VKM F-808. It synthesizes enzyme with activity 28 U/ml. Optimal conditions for fucosidase biosynthesis by selected strain of A. awamori VKM F-808 was found, led to improving of fucosidase activity by 25%.

Keywords: fucosidase, fucoidan, fucose

В последние годы одними из важнейших направлений биотехнологии являются поиск, изучение и разработка способов получения биологически активных веществ различного происхождения. Особый интерес в последние годы представляет фукоза – 6-дезокси-галактоза. Она широко распространена в клетках живых организмов и является важным компонентом метаболизма млекопитающих. Фукоза входит в состав многих гормонов и других биологически активных веществ. Необычайно важна роль молекул фукозы в репродуктивных и иммунных процессах позвоночных, она выполняет важные биологические функции в процессах онтогенеза и клеточной дифференциации [1]. Показано, что от процессов фукозилирования зависит дифференцировка Т-клеток. Абнормальное фукозилирование часто наблюдается при различных заболеваниях человека, включая рак, и часто связано с нарушением синтеза фукозидаз [2].

Немаловажным является и тот факт, что гетероолигосахаридные цепи иммуноглобулинов содержат в основном остатки таких гексоз, как галактоза, манноза, фукоза. Изучение углеводных групп представляет большой интерес, обусловленный их участием в самосборке иммуноглобулина из полимеризующих субъединиц [3]. Предполагается, что включение минорных сахаров на раннем этапе синтеза иммуноглобулинов способствует их конформационным изменениям.

Благодаря своим свойствам, фукоза является уникальным углеводом, играющим ключевую роль в процессах молекулярного и клеточного узнавания у всех живых организмов. Поэтому разработка способов получения препаратов чистой фукозы (как и богатых фукозой олигосахаридов) для терапевтического применения, несомненно, является одним из важных направлений современной биотехнологии. Одним из перспективных способов получения фукозы является ферментативный гидролиз фукоиданов – матричных полисахаридов бурых водорослей. В настоящее время коммерческих препаратов ферментов, способных расщеплять сульфатированные полисахариды морских водорослей, не существует. Сведения о выделенных и охарактеризованных на сегодняшний день фукозидазах немногочисленны, большинство из них обладают низкой активностью и являются 1,2-экзофукозидазами, вследствие чего не способны гидролизовать фукоидан водорослей, содержащий преимущественно 1,3-, 1,4- и 1,6-фукозидные связи [4]. Следовательно, задача поиска продуцента фукозидазы, способной эффективно расщеплять фукоидан, является весьма актуальной.

Материалы и методы исследования

Скрининг

Скрининг проводили на минимальной агаризованной модифицированной среде Чапека [5] с 1% фукоидана, полученного по методике [6] из водоросли *Fucus vesiculosis,* в качестве единственного источника углерода. Критерием отбора служила интенсивность роста микроорганизма на данной среде, указывающая на его способность расщеплять фукоидан до фукозы.

Глубинное культивирование микроорганизмов

Культуры микроорганизмов выращивали на жидкой среде Чапека с добавлением 1% фукоидана водоросли *Fucus vesiculosis.* Бактерии культивировали в шейкере-инкубаторе Infors при 150 об./мин при температуре 30 °С в колбах емкостью 250 см^3, содержащих 100 см^3 среды, в течение 72 ч, грибы – в аналогичных условиях в течение 120 ч. Отбор культуральной жидкости для определения активности фукозидазы производили каждые 24 ч. Клетки отделяли от среды центрифугированием при 3000 g в течение 30 мин. Супернатант использовали для тестирования активности внеклеточных ферментов.

Определение активности α-L-фукозидазы

Активность фукозидазы определяли по изменению количества свободной фукозы в пробе по методу Дише [7], который основан на способности фукозы при кипячении с сильными минеральными кислотами образовывать 5-метилфурфурол, в отличие от других гексоз, благодаря чему возможно ее дифференцированное определение.

Реакционную смесь, состоящую из 1 см^3 водного раствора фукоидана с массовой долей 1% и 0,5 см^3 раствора фермента, инкубировали при температуре 30 °С в течение 1 ч.

Одновременно проводили контрольный эксперимент, в котором вносили 0,5 см^3 раствора инактивированного фермента. По истечении времени гидролиза опытную и контрольную пробу разводили дистиллированной водой в 20 раз и определяли свободную фукозу по методу Дише.

За единицу активности фукозидазы принимали такое количество фермента, которое образует 1 мМоль фукозы за 1 мин в стандартных условиях.

Результаты исследования и их обсуждение

Для скрининга были отобраны представители родов, наиболее часто упоминаемых в литературе [8, 9, 10] как продуценты фукозидаз: микромицеты рода *Aspergillus*, бактерии родов *Bacillus, Clostridium, Alteromonas,* актиномицеты родов *Thermus* и *Streptomyces,* а также штаммы высокоактивных продуцентов карбогидраз из музея чистых культур кафедры микробиологии и биохимии ВГТА (всего 52 штамма). Сравнительная характеристика изученных штаммов по интенсивности роста представлена в табл. 1. Изученные штаммы, не проявившие способности к росту на среде, содержащей в качестве единственного источника углерода фукоидан, в таблице не приведены.

Из табл. 1 видно, что максимальную способность к росту на среде с фукоиданом проявили штаммы *Aspergillus awamori ВКМ F-2250, A. awamori ВКМ F-808, A. niger ВКМ F-33, A. niger ВКМ F-2092, Trihoderma harzianum F144*, Bacillus subtlilis 75, B. licheniformis, B. polimyxa B29, Streptomuces frodispirales.* Для количественной оценки активности фукозидазы указанные культура выращивали методом глубинного культивирования. В табл. 2 представлена динамика биосинтеза фукозидазы выбранными микроорганизмами.

Таблица 1

Интенсивность роста различных микроорганизмов на среде с фукоиданом

Наименование штамма	Интенсивность роста
Actinomyces ornutus	+
Streptomyces frodispirales	+++
Bacillus subtilis 68	++
B. subtilis 75	+++
B. licheniformis	+++
B. polimyxa B29	++
Rhizopus oryzae 593	++
Rh. japonicus 1217	++
Aspergillus niger 35	+++
A. niger ВКМ F-33	++++
A. niger ВКМ F-2092	+++
A. awamori ВКМ F-2250	+++
A. awamori ВКМ F-808	++++
Penicillium canescens	++
P. wartmanii	++
Trihoderma viridae	+
T. harzianum F114	+++
T. harzianum F114*	++++

Примечание:
++++/+++ – выраженный рост;
++/+ – слабо выраженный рост.

Из представленных данных видно, что бактерии проявляли максимальную способность к биосинтезу фукозидазы уже к 24 часу культивирования, фукозидазная активность бактериальных продуцентов в среднем была в 2–3 раза ниже, чем у микромицетов. Максимальная активность целевого фермента среди микромицетов отмечена у *A. awamori ВКМ F-808,* причем увеличение активности с 72 до 96 ч культивирования было незначительным, поэтому оптимальной продолжительностью выращивания следует считать 72 ч.

Далее определяли оптимальные условия культивирования выбранного продуцента *A. awamori ВКМ F-808.*

Исследования влияния источников углерода на биосинтез фукозидазы проводили на стандартной среде Чапека, поочередно варьируя качественный и количественный состав источников углерода. Из представленных на рис. 1 и 2 данных видно, что максимальный биосинтез фукозидазы наблюдается на среде с фукоиданом при его содержании в среде 0,5%.

Таблица 2

Сравнительная характеристика фукозидазной активности отобранных по результатам скрининга микроорганизмов

Наименование культуры	Активность фукозидазы, ед/см^3 при длительности культивирования, ч				
	24	48	72	96	120
Aspergillus awamori ВКМ F-2250	-	21,23	22,18	23,05	20,54
A. awamori ВКМ F-808	-	18,76	27,89	27,91	25,76
A. niger ВКМ F-33	-	21,85	23,30	25,23	25,29
A. niger ВКМ F-2092	-	16,57	19,32	20,10	19,07
Trihoderma harzianum F144*	-	13,27	18,12	24,42	26,65
Bacillus subtlilis 75	13,35	9,85	6,73	-	-
B. licheniformis 72	11,81	10,56	9,87	-	-
B. polimyxa B29	17,00	18,61	17,15	-	-
Streptomyces. frodispirales	10,81	13,35	9,87	-	-

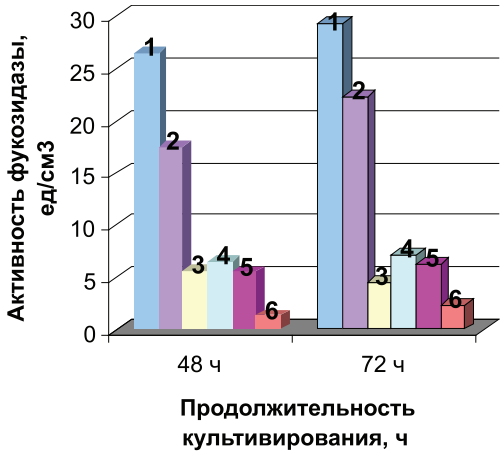

Рис. 1. Зависимость активности фукозидазы от источника углеводного питания: 1 – фукоидан, 2 – фукоза, 3 – манноза, 4 – галактоза, 5 – глюкоза

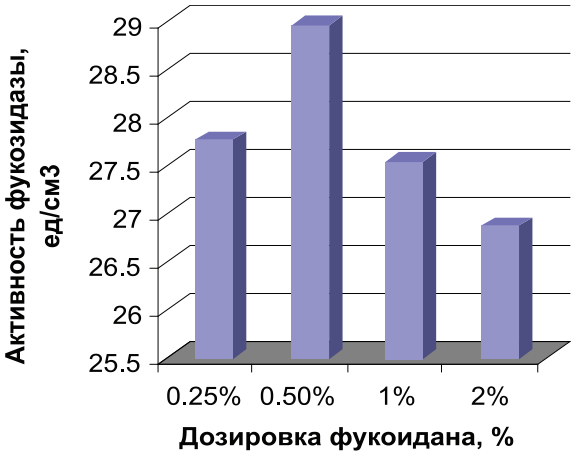

Рис. 2. Зависимость активности фукозидазы от дозировки фукоидана при продолжительности культивирования 72 ч

Известно, что на биосинтез ферментов оказывает определенное влияние на ряд условий, среди которых величина pH и температура культивирования играют основную роль.

Исследование влияния исходного значения pH среды на биосинтез фукозидазы показало, что данный продуцент проявляет биосинтетическую способность в широком диапазоне значений pH от 4,0 до 9,0. Как видно из представленных на рис. 3 данных, максимальный биосинтез наблюдался при pH 7,0–7,5. Отклонение pH питательной среды от оптимальных для синтеза фермента значений как в кислую, так и в щелочную сторону влечет за собой значительное снижение активности фукозидазы в культуральной жидкости.

На рис. 4 показано влияние температуры на биосинтез фукозидазы *A. awamori 808.* Культивирование проводили при pH среды 7,0. Установлено, что температура 30 °C обеспечивала наибольшее значение ферментативной активности. Увеличение температуры до 45 °C значительно угнетало синтез фермента, активность которого составляла не более 35 % от максимальной.

Таким образом, были определены оптимальные параметры культивирования для выбранного продуцента фукозидазы *A. awamori ВКМ F-808:* температура 30 °C, pH 7,0–7,5, концентрация вносимого в качестве индуктора фукоидана 0,5 %, продолжительность культивирования 72 часа. При таких условиях активность фукозидазы достигала 35 ед/мл, что выше первоначальной активности на 25 %.

Заключение

По результатам проведенного скрининга, нами был выявлен продуцент активной фукозидазы, способной гидролизовать фукоидан бурых водорослей рода *Fucus*. Определены оптимальные условия для биосин-

теза фукозидазы выбранным штаммом *A. awamori ВКМ F-808*, что позволило повысить активность фукозидазы на 25%. Найденный продуцент может быть использован для получения ферментного препарата фукозидазы, который найдет применение при производстве фукозы из дешевого и малоиспользуемого сырья – биомассы бурых водорослей, широко произрастающих в акватории Российской Федерации, для целей пищевой, кормовой и фармацевтической промышленности.

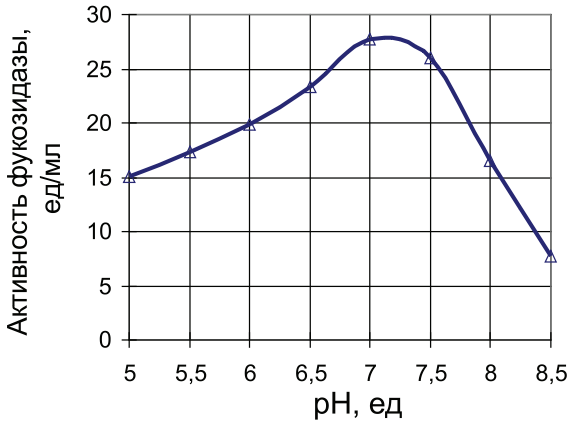

Рис. 3. Зависимость активности фукозидазы от pH среды

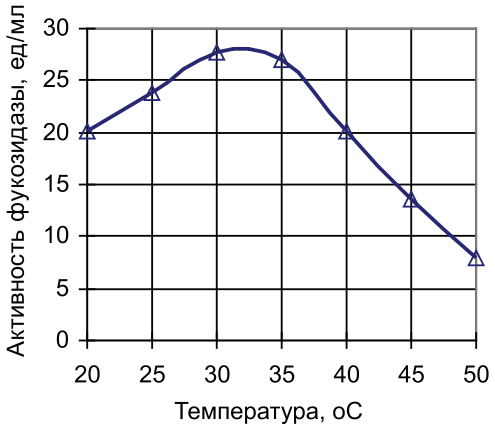

Рис. 4. Зависимость активности фукозидазы от температуры культивирования

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы, Госконтракт № П 260.

Список литературы

1. Becker D. J.Fucose: biosynthesis and biological function in mammals / D.J. Becker, J.B. Lowe // Glycobiology. – 2003. – Vol. 13, №13. – P. 41–53.

2. Pharmacological properties of fucose. Applications in age-related modifications of connective tissues / G. Péterszegi [et. al] // Biomedicine & Pharmacotherapy. -2003. – Vol. 57. – P. 240–245.

3. Фукоза: биологическая роль, пути получения и перспективы применения / Д.А.Черенков и др. // Биотехнология – 2010. – №6. – С. 63–71.

4. Состав и возможности использования бурых водорослей дальневосточных морей / Н. М. Аминина [и др.] // Вестник ДВО РАН. – 2007. – №7. – С. 123–130.

5. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов и др. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.

6. Способ комплексной переработки бурых водорослей с получением препаратов для медицины и косметологии: пат. № 2240816. / Шевченко Н. М. и др. – 2004, Бюл. №13.

7. Dische Z. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination / Z. Dische, L.B. Shettles // J. Biol. Chem. – 1948. – Vol. 175, № 2. – P. 595–603.

8. Kochibe N. Purification and properties of alpha-L-fucosidase from Bacillus fulminans // J. Biochem. – 1973. – Vol. 74. – P. 1141–1149.

9. Purification and characterization of alpha-L-fucosidases from Streptomyces sp. OH11242 / Y. Goso [et al.] // Comp. Biochem. Physiol. & Biochem. Mol. Biol. – 2001. – Vol. 130, № 3. – P. 375–383.

10. Aminoff D. Purification and general properties of 1,2 -L-ficosidase from Clostridium Perfringens / D. Aminoff, K. Furukawa // J. Biol. Chem. – 1970. – Vol. 245. – P. 1659–1669.

Рецензенты:

Епринцев А.Т., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биохимии и физиологии клетки ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», г. Воронеж;

Болотов В.М., д.т.н., профессор, зав. кафедрой органической химии ГОУ ВПО «Воронежская государственная технологическая академия», г. Воронеж.

Работа поступила в редакцию 30.05.2011.