

Аспирант В.А. Анненков, студент Е.А. Першина,
доцент Д.А. Черенков, профессор О.С. Корнеева
(Воронеж. гос. ун-т инж. технол.) кафедра микробиологии и биохимии,
тел. (473) 255-55-57

Подбор оптимальных условий индукции биосинтеза рекомбинантной липазы LipA

Рассмотрено влияние условий биосинтеза (pH, t °, времени культивирования, концентрации IPTG-индуктора, времени внесения IPTG и времени биосинтеза) на получение максимального количества фермента LipA.

The influence of the conditions of biosynthesis (pH, t °, the cultivation time, the concentration of IPTG-inducer, time of IPTG application and time of biosynthesis) on obtaining the maximum amount of the enzyme LipA.

Ключевые слова: рекомбинантная липаза, индуктор, IPTG, активность фермента, биосинтез.

При культивировании микроорганизмов наибольшее значение имеет выбор оптимальных условий для успешного роста продуцента и биосинтеза биологически активных веществ.

Это в полной мере относится как к нативным так и к рекомбинантным продуцентам. Кроме того, для рекомбинантных микроорганизмов, в которых целевой ген находится под контролем индуцибельного промотора, на первый план выходит оптимизация условий контролируемой индукции биосинтеза. Ранее нами была получена генетическая конструкция на основе вектора PET23b(+), содержащая ген липазы LipA из *B.subtilis* 168 под контролем индуцибельного промотора T7 [1]. В данной системе индуктором биосинтеза является Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ, англ. IPTG) используемый в качестве аналога аллолактозы, метаболита лактозы, который запускает транскрипцию lac-оперона.

С целью оптимизации условий биосинтеза целевого фермента было исследовано влияние температуры, исходного pH среды, времени внесения индуктора, времени биосинтеза после внесения IPTG-индуктора, концентрации IPTG, времени культивирования на уровень продукции липазы LipA трансформированными клетками *E. coli* TOP-10.

Объектом исследований являлась культура микроорганизмов *Escherichia coli*, генетически модифицированная методом рекомбинантных ДНК [1]. Донором ДНК являлся штамм *Bacillus subtilis* 168. В качестве контроля использовались нетрансформированные клетки *E. coli*, штамм TOP-10.

Клетки *E.coli* выращивали на среде Лuria-Бертани (ЛБ), К среде для трансформированных клеток добавляли ампициллин в расчете 1 мкл антибиотика на 1 мл питательной среды. Ампициллин необходим для положительной селекции клеток, содержащих рекомбинантную плазмидную ДНК. Для выращивания культуры на орбитальном термостатируемом шейкере использовали пробирки объемом 50 мл. При посеве применяли инокулюм, выращенный за 16 часов, разбавленный 5-6 частями питательной среды с ампициллином. Клетки культивировали при 37°C и частоте вращения платформы 120 об/мин.

Так как нативные клетки *E. coli* практически не синтезируют липазу, дополнительно в качестве положительного контроля в эксперименте использовали ферментный препарат, полученный из *Yarrowia lipolytica*. Данный выбор объясняется доступностью и простотой культивирования микроорганизма. Эти дрожжи способны синтезировать липазы с высокой активностью.

Y. lipolytica выращивали на специальной питательной среде, состоящей из дрожжевого экстракта, мочевины, солей металлов (магния, калия и кальция), глюкозы, соевой муки и оливкового масла [2].

Культивирование *Y. lipolytica* проводили в течение 120 часов при 32 °C в стеклянных колбах емкостью 500 мл. Уровень биосинтеза липазы рекомбинантными клетками определяли по липолитической активности ферментов культуральной жидкости

Для определения активности фермента использовали титриметрический метод опре-

деления липазной активности с применением субстрата оливкового масла [2].

Метод основан на учете количества образовавшихся жирных кислот в процессе гидролиза оливкового субстрата, в качестве которого в эксперименте выступает смесь оливкового масла с 2 %-ным раствором поливинилового спирта. рН оливковой смеси с помощью фосфатного буфера доводят до значения 7,0. Перед титрованием смесь выдерживают при температуре 37 °С.

За единицу активности липазы принимали количество фермента, которое образует 1 мкмоль олеиновой кислоты за 1 ч в стандартных условиях. Липазную активность рассчитывали по следующей формуле:

$$LA_x = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,014123 \cdot 1}{a}, \quad (1)$$

где V_1 и V_2 – количество 0,05 н раствора гидроксида натрия, израсходованное на опытную и контрольную пробы, см³; a – количество исследуемого препарата в реакционной среде, г; 0,014123 – титр 0,05 Н раствора NaOH по олеиновой кислоте.

Была исследована зависимость уровня биосинтеза липазы от времени внесения индуктора. В качестве опыта использовали эмульсию субстрата, выдержанную в стандартных условиях, с добавлением испытуемого фермента и последующей инактивацией его этиловым спиртом через 1 час.

Отрицательным контролем служил оливковый субстрат с добавлением фермента и немедленной его инактивацией.

В качестве положительного контроля использовали культуральную жидкость, *Y. lipolytica*, разбавленную дистиллированной водой в пропорции 1:100.

Липазную активность измеряли через 0-7 ч после внесения индуктора. В результате эксперимента наибольшая активность липазы была отмечена при добавлении индуктора через 4 ч после начала культивирования. При этом, внесение IPTG через 5 и 6 часов с момента посева оказалось менее эффективным, так же как и внесение в более ранние сроки культивирования. Полученные данные свидетельствуют о том, что наибольшим биосинтетическим потенциалом трансформированные клетки обладают через 4 часа после начала культивирования в данных условиях.

Результаты эксперимента представлены на рисунке 1.

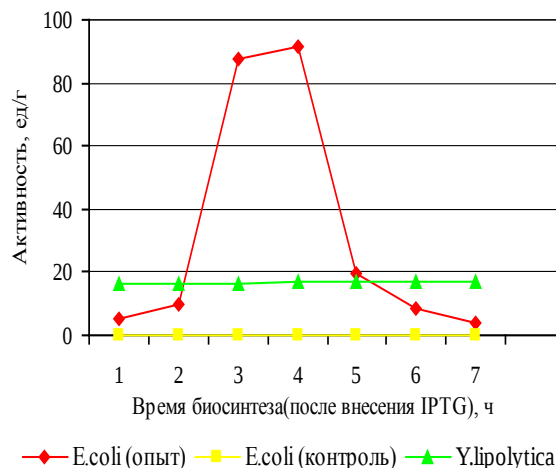


Рисунок 1 - Зависимость липазной активности культуры рекомбинантной *E.coli* от времени внесения индуктора.

Также допустимо добавлять индуктор и через 3 ч после посева (активность равна 89 ед/г).

Далее определяли зависимость активности липазы от времени биосинтеза (после внесения индуктора). Индуктор вносили через 4 часа после начала выращивания рекомбинантной *Escherichia coli*. В каждую пробирку вносили IPTG концентрацией 1 ммоль и определяли липолитическую активность в культуральной жидкости с периодичностью в 1 час. Как следует из данных, приведенных на рисунке 2, максимальная активность фермента наблюдается через 3 ч после внесения IPTG. При этом удельная активность липазы составляет 91,8 единиц на 1 г белка. Это значение примерно в 5,5 раз больше, максимальной активности *Y. lipolytica* в эксперименте и более, чем в 100 раз липазы, продуцируемой нативной *E. coli*. Через 5 ч после внесения IPTG липазная активность снижается, что может быть связано с частичной инактивацией наработанного фермента.

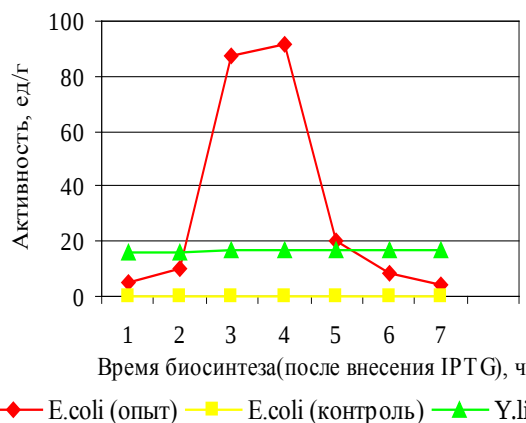


Рисунок 2 - Зависимость активности липазы от времени биосинтеза (после внесения индуктора).

Кроме того, была определена зависимость активности липазы от концентрации вносимого индуктора. Известно, что для индукции лактозного оперона IPTG используют в концентрациях от 0,1 до 2 мМ [3]. Концентрация ниже данного значения не позволит запустить транскрипцию *lac*-оперона. Если добавить индуктор в больших концентрациях, то это способствует снижению концентрации лактозы при ее метаболизме. В отсутствие или при низкой концентрации лактозы в клетке белок-репрессор, который является продуктом оперона *LacI*, обратимо соединяется с операторным районом и препятствует транскрипции. Поэтому одной из задач оптимизации условий биосинтеза являлось определение концентрации вносимого индуктора, вызывающей максимальный уровень транскрипции целевого гена.

Индуктор в различных концентрациях добавляли через 4 ч после начала культивирования трансформированных клеток. Отбор проб для определения активности липазы проводили через 3 ч после внесения индуктора, поскольку это время является оптимальным для биосинтеза.

Результаты представлены на рисунке 3.

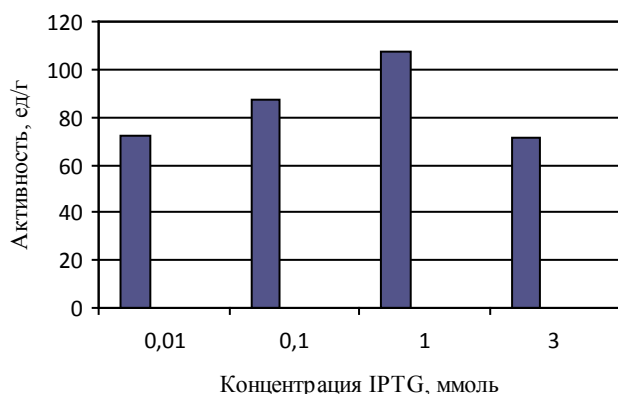


Рисунок 3 - Зависимость липазной активности от концентрации вносимого индуктора

При обработке полученных данных, установленных экспериментально, активность липазы прямо пропорциональна концентрации внесенного индуктора. Минимальные значения активности, равные 71,1 ед/г и 71,6 ед/г, наблюдаются при концентрации 3 ммоль и 0,01 ммоль соответственно, максимальное – при 1 ммоль. Оно равно 106,6 ед/г. Отсюда следует, что благодаря увеличению концентрации IPTG до допустимого значения (не более 2 ммоль), можно увеличить интенсивность биосинтеза липолитического фермента более чем на 50%.

Затем была определена зависимость активности липазы от температуры и pH. Известно, что оптимальными условиями культивирования *E.coli* является pH = 6,0–7,0, $t^\circ = 37^\circ\text{C}$. Также кишечная палочка может развиваться при большем диапазоне активной кислотности и температур.

Многие штаммы *E.coli* выдерживают сильноокислые (pH от 2,4 и выше) и сильнощелочные (pH до 11,6) среды, причем воздействие кислот на культуру не так пагубно, как наличие сильного основания в субстрате [4].

Температура среды, при которой кишечная палочка может нормально развиваться, колеблется от 20 до 50 $^\circ\text{C}$ [4].

Однако температура и pH среды культивирования могут оказывать влияние на интенсивность биосинтеза рекомбинантного фермента. В связи с этим необходимо экспериментальным путем определить оптимальные значения данных параметров.

Для определения влияния температуры на липолитическую активность фермента рекомбинантные клетки *E.Coli* выращивали на жидкой питательной среде Лурия-Бертани с добавлением ампициллина. Культивирование проводили в орбитальном шейкере при температурах 21 $^\circ\text{C}$, 28 $^\circ\text{C}$, 30 $^\circ\text{C}$, 32 $^\circ\text{C}$, 34 $^\circ\text{C}$, 36 $^\circ\text{C}$, 38 $^\circ\text{C}$, 40 $^\circ\text{C}$, 42 $^\circ\text{C}$, 50 $^\circ\text{C}$, 60 $^\circ\text{C}$.

Максимально активный ферментный препарат был получен при $t^\circ = 40\text{--}42^\circ\text{C}$ (активность 103 ед/г). Зависимость активности фермента от температуры представлена на рисунке 4. Стоит отметить, что при низких температурах активность фермента крайне мала (при 20 $^\circ\text{C}$ активность менее 20 ед/г).

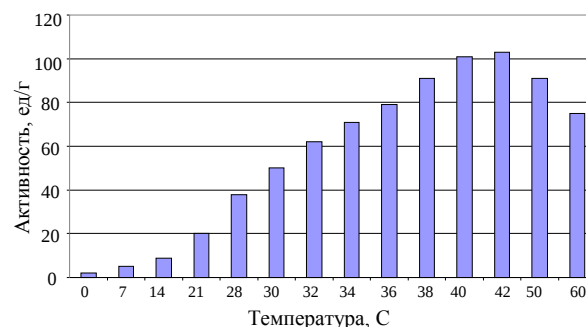


Рисунок 4 - Зависимость активности липазы от температуры

Аналогичным образом определяли оптимальный для биосинтеза уровень pH среды. Регулирование необходимого значения pH в субстрате проводили путем добавления

в питательную среду щелочи (NaOH), либо кислоты (H₂SO₄).

Определение липолитической активности проводили в диапазоне pH=2-13 с шагом в 1 единицу активной кислотности.

В результате эксперимента установлено, что наиболее активный ферментный препарат можно получить путем культивирования продуцента при pH=6 (107,4 ед/г). При pH≤3 активность липазы близка к 0.

Результаты эксперимента отображены на рисунке 5.

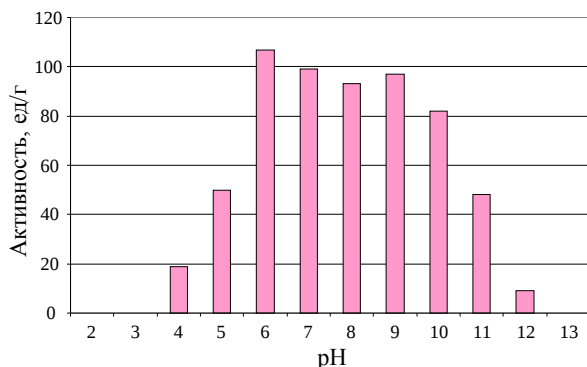


Рисунок 5 - Зависимость липолитической активности от pH

Результаты подбора оптимальных условий индукции биосинтеза рекомбинантной липазы LipA, продуцируемой трансформированными клетками *E. coli* TOP-10 представлены в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Оптимальные условия для биосинтеза рекомбинантной липазы клетками *E. coli*

Параметр оптимизации	Величина
Время внесения IPTG	4ч
Время биосинтеза после внесения индуктора	4ч
Общее время культивирования	8ч
Концентрация индуктора	1ммоль
Температура	42°C
pH	6

В результате выполнения данной работы были оптимизированы условия биосинтеза рекомбинантной липазы клетками *E. coli*. Полученные результаты могут быть использованы для разработки лабораторного регламента получения рекомбинантной липазы LipA [5].

ЛИТЕРАТУРА

1 Черенков, Д. А. Получение термостабильной липазы с помощью методов компьютерного моделирования и генной инженерии [Текст] / Д. А. Черенков, В. А. Анненков, Е. В. Першина и др. // Актуальная биотехнология. – 2013. - №3. - С. 34-35.

2 Польшалина, Г. В. Определение активности ферментов [Текст] / Г. В. Польшалина, В. С. Чередниченко, Л. В. Римарева. – М.: ДеЛи принт, 2003 – 375 с.

3 Ahmad, S. Thermostable *Bacillus subtilis* lipases: in vitro evolution and structural insight [Text] / S. Ahmad, M. Z. Kamal, R. Sankaranarayanan et al // J. Mol. Biol. – 2008. - № 381 (2). - P. 324-340.

4 Don, S. M. Optimal conditions for the growth of *E. coli* [Text] / S. M. Don // Biology EEI.- 2008. - № 4. - P. 3-18.

5 Shariff, F. M. A newly isolated thermostable lipase from *Bacillus* sp [Text] / F. M. Shariff, R. N. Rahman, M. Basri et al // J. Mol. Sci. – 2011. - № 12(5). - P. 2917 – 34.

REFERENCES

1 Cherenkov, D. A. Production of thermostable lipases using computer modeling and genetic engineering [Text] / D. A. Cherenkov, V. A. Annenkov, E. V. Pershyna et al // Actual biotechnology. - 2013. - № 3. - P. 34-35.

2 Polygalina, G. V. Determination of enzyme activity [Text] / G. V. Polygalina, V. S. Cherednychenko, L. V. Rimareva. – M.: DeLee print, 2003 - 375 p.

3 Ahmad, S. Thermostable *Bacillus subtilis* lipases: in vitro evolution and structural insight [Text] / S. Ahmad, M. Z. Kamal, R. Sankaranarayanan et al // J. Mol. Biol. – 2008. - № 381 (2). - P. 324-340.

4 Don, S. M. Optimal conditions for the growth of *E. coli* [Text] / S. M. Don // Biology EEI.- 2008. - № 4. - P. 3-18.

5 Shariff, F. M. A newly isolated thermostable lipase from *Bacillus* sp [Text] / F. M. Shariff, R. N. Rahman, M. Basri et al // J. Mol. Sci. – 2011. - № 12(5). - P. 2917 – 34.