

УДК 577.15

ОЦЕНКА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ С, ПОЛУЧЕННОЙ В СИСТЕМЕ *Bacillus mojavensis* ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В ПОЛУПРОМЫШЛЕННЫХ ФЕРМЕНТЕРАХ

© 2023 г. В. Ю. Чиркова^{1, *}, Д. Н. Щербаков^{1, 2}, Е. А. Шарлаева¹, М. В. Ширманов¹, П. В. Колосов¹, Е. А. Колосова^{1, 2}, А. Н. Иркитова¹, А. В. Малкова¹, Д. Е. Дудник¹, Е. Н. Каргашилова¹, И. Ю. Евдокимов¹

¹ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул 656049 Россия

²ГНЦ Вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово 630559 Россия

*e-mail: varvara.chirkova@gmail.com

Поступила в редакцию 05.07.2023 г.

После доработки 17.07.2023 г.

Принята к публикации 20.07.2023 г.

Фосфолипаза С – фермент класса гидролаз, катализирующий расщепление фосфолипидов до диацилглицеридов и полярных фосфатсодержащих групп. Данный фермент перспективен для применения в различных отраслях промышленности: при рафинировании масел, получении биодизельного топлива, для ускорения сроков созревания сыров, использовании в качестве эмульгатора и пр. В рамках настоящего исследования проведено опытное глубинное культивирование нового штамма-продуцента *Bacillus mojavensis* в условиях полупромышленных ферментеров разного объема. Через 8 ч наработки в 15-литровом биореакторе при 37°C получен ферментный препарат рекомбинантной фосфолипазы С с максимальной активностью 307.35 ед. акт./мл, характеризующийся температурным оптимумом 60°C и способный сохранять свою активность без добавления консервантов при комнатной температуре в течение месяца.

Ключевые слова: активность, *Bacillus mojavensis*, культивирование, рекомбинантные ферменты, фосфолипаза С, ферментация

DOI: 10.56304/S0234275823020023

Фосфолипаза С (КФ 3.1.4.3) – фермент класса гидролаз, небольшой белок (28 кДа), катализирующий расщепление фосфолипидов до диацилглицеридов и полярных фосфатсодержащих групп. Данный фермент обнаружен у различных живых организмов, в том числе у широкого спектра грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий, и обладает важными технологическими свойствами: высокой удельной активностью, термостабильностью, широкой субстратной специфичностью. Для внедрения в биотехнологическое производство наиболее перспективными являются генетически модифицированные штаммы-продуценты целевых ферментов, в том числе фосфолипаз. Рекомбинантная фосфолипаза С особенно востребована в связи с возможностью ее практического применения в различных отраслях промышленности: при рафинировании масел (соевого, пальмового, подсолнечного и др.) [1, 2], в предварительной обработке масел при получении биодизельного топлива, для ускорения сроков

созревания сыров, в качестве эмульгатора в молочной и хлебопекарной промышленности, при производстве майонеза и др. [3]. В настоящее время российских коммерческих препаратов фосфолипазы С на рынке нет, а в промышленности используют зарубежные аналоги – например, фосфолипазу С Verenium Purifine PLC (Verenium Corporation, США) или фосфолипазу С из *Clostridium perfringens* (Sigma, США) [3]. В патенте [4] описан рекомбинантный штамм бактерий *B. subtilis* – продуцент фосфолипазы С, с активностью фермента в культуральной жидкости 210 ед. акт./мл при глубинном культивировании в 3 л ферментере.

Цель данного исследования – оценить ферментативную активность рекомбинантной фосфолипазы С (PLC), полученной при глубинном культивировании штамма-продуцента *B. mojavensis* в опытно-промышленных ферментерах, а также определить оптимальное время наработки фермента.

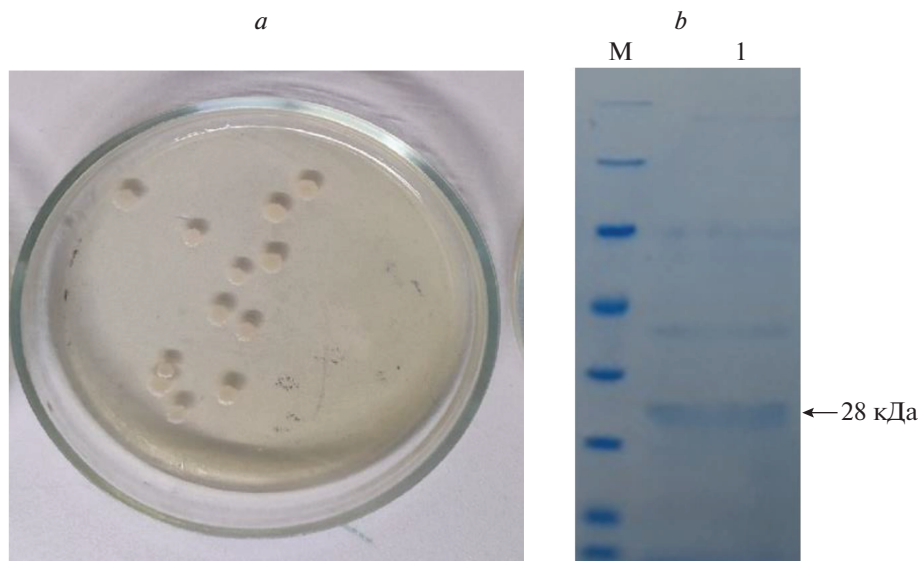


Рис. 1. *a* – Морфология колоний штамма *B. Mojavensis* BDV-1/PLC6H. *b* – Электрофоретическое разделение белка в ПААГ: М – маркер молекулярного веса белков, 1 – образец надосадочной жидкости BDV-1/PLC6H.

Fig. 1. *a* – Colony morphology of the *B. Mojavensis* BDV-1/PLC6H strain. *b* – Electrophoretic separation of protein in PAAG: M – protein molecular weight marker, 1 – supernatant sample BDV-1/PLC6H.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штамм-продуцент и среды культивирования

В качестве продуцента фосфолипазы С был использован рекомбинантный штамм *B. Mojavensis* BDV-1/PLC6H, полученный электропорацией плазмидой pBSU-PLC6H штамма реципиента *B. Mojavensis* BDV-1 из коллекции АлтГУ, ранее нами депонированный в ВКСМ (Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ФГБНУ ВНИИСХМ) в качестве штамма-реципиента. Для этой культуры характерны плоские округлые кремовые колонии, 3–4 мм в диаметре. Интенсивность окрашивания неровного края колонии меньше, чем в центре (рис. 1а). Для ферментации использовали ферментационную жидкую среду следующего состава (г/л): меласса – 25, кукурузный экстракт – 12.5, дрожжевой экстракт – 1, пептон – 0.5, MgSO₄ – 0.25, MnSO₄ – 0.03, CoCl₂ – 0.046, CaCl₂ – 1, соф-эксил – 0.5, вода водопроводная – до 1 л, pH 6.8–7.0. Компоненты ферментационной среды были предоставлены Российскими компаниями: пептон и дрожжевой экстракт – компания “Диа-М”, соли, пеногаситель и промышленные компоненты (меласса, кукурузный экстракт) – компания “Алтай-Мед”.

Условия культивирования

Глубинное культивирование проводили в 15 и 250 л ферментерах (ООО “Сторге”, Россия).

Приготовление посевного материала. Посевной материал для 15 л ферментера выращивали на среде YTx2 (г/л): пептон – 16, дрожжевой экстракт – 10, NaCl – 5, dH₂O – до 1 литра, pH 7.2 в колбах на качалке “Innova 44” (New Brunswick, США) при 220 об/мин (эксцентриситет 5 см), температуре 37°C в течение 24 ч. В качестве посевной для 250 л ферментера использовали культуру, выращенную в 15 л аппарате. Коэффициент заполнения средой для 15 л – 0.66, а для 250 л – 0.4.

Ферментация. Ферментацию проводили при pH 6.8, температуре 37°C, расходе воздуха 0.250–1.5 м³/ч, скорости перемешивания 100–500 об./мин; рО₂ – 30–50% в фазе интенсивного роста культуры. Продолжительность процесса ферментации 24 ч.

На протяжении процесса отбирали аликвоты культуральной жидкости для оценки морфологических параметров выращиваемой культуры, контроля отсутствия контаминации, корректировки pH, измерения оптической плотности (ОП) при длине волны 600 нм. Измерение ОП₆₀₀ производили с помощью спектрофотометра UV-1280 (Shimadzu, Япония), предварительно разбавив пробу дистиллированной водой в 10 раз.

Определение ферментативной активности

Надосадочную жидкость отделяли проточным центрифугированием на проточной центрифуге GTGQ-1251 (Zhengzhou Grace Machinery Equipment, Китай) при 15000 об./мин. Наличие целевого белка в образцах подтверждали методом белкового электрофореза (рис. 1b). Форез проводили в

денатурирующих условиях в камере Mini Protean (BioRad, США) в 15%-ном ДСН-ПААГ по Лэммли [5], визуализацию гелей проводили окрашиванием кумасси. Фосфолипазную активность определяли с использованием *p*-нитрофенил-фосфорилхолина (Sigma-Aldrich, Германия) в качестве субстрата. Образующийся в результате гидролиза *p*-нитрофенол определяли спектрофотометрически на планшетном флуориметре-спектрофотометре ClarioStar Plus (BMG Labtech, Германия) при длине волны 405 нм.

Реакционную смесь, содержащую 20 мкл культуральной жидкости и 180 мкл субстрата в буфере, состоящем из 10 мМ тетрабората натрия, 0.1 М $ZnCl_2$ и 60% (масс/объем) сорбитола, инкубировали при 37°C в течение 20 мин. Активность фермента рассчитывали согласно методике [6].

Определение температурного профиля полученного фермента проводили путем предварительного прогрева образцов в течение 30 мин при температурах 50–80°C.

Для оценки влияния консервантов и температуры хранения на органолептические свойства, а также активность фосфолипазы С, были заложены карантинные аликвоты раствора фермента объемом 100 мл со следующими вариантами консервантов: 1) глицерин – 25%; 2) хлорид натрия (10%) + бензоат натрия (0.5%); 3) хлорид натрия (10%) + бензоат натрия (0.2%) + сорбат калия (0.3%). Образцы хранили при двух температурных режимах: +4°C и +25°C. В качестве контроля использовали образец без добавления консерванта. Повторное определение активности и оценку органолептических свойств проводили после 30 сут хранения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показатели использованного посевного материала: численность бактерий *B. mojavensis* BDV-1/PLC6H 1.4×10^7 КОЕ/мл, рН – 6.41 ± 0.31 , оптическая плотность (ОП₆₀₀) – 0.250 ± 0.037 . В 15 и 250-литровых ферментерах кинетика роста культуры была схожей. Основные показатели результатов ферментации представлены в табл. 1. Через 24 ч роста в 250 л ферментере был зафиксирован финальный титр бактерий – 1.6×10^7 КОЕ/мл.

Оценка фосфолипазной активности

Для оценки фосфолипазной активности в ходе ведения циклов ферментаций отбирали аликвоты. Согласно полученным результатам, в первые 4 ч культивирования активность надосадочной жидкости достоверно не различалась при наработке в аппаратах разного объема; через 7 ч – в меньшем ферментере наблюдалось более высокое значение активности, чем в 250 л аппарате.

Максимальная фосфолипазная активность в 15 л ферментере была достигнута к 8 ч роста культуры ($A = 307.4$ ед.акт./мл), в ферментере 250 л – через 13 ч ферментации ($A = 248.2$ ед.акт./мл). Дальнейшее культивирование в обоих случаях не приводило к росту активности (табл. 2).

Определение температурного профиля

Одной из важных характеристик любого фермента является определение его температурного профиля и нахождение температурного оптимума. Для этого эксперимента была проведена отдельная наработка рекомбинантной фосфолипазы С (PLC) в колбах объемом 50 мл с использованием шейкера-инкубатора “Innova 44” при температуре 37°C в течение 8 ч. После центрифугирования в образцах надосадочной жидкости определяли фосфолипазную активность, предварительно прогревая пробы в течение 30 мин в диапазоне температур 50–80°C с шагом в 10°C. На рис. 2 представлены данные по изменению активности PLC (ед.акт./мл) в сравнении с аналогичными значениями, полученными для коммерческого препарата фосфолипазы С из *Bacillus cereus* (“Sigma-Aldrich”, Израиль). Температурные оптимумы действия коммерческого препарата и фосфолипазы С, полученной в эксперименте, совпадают и приходятся на 60°C. При дальнейшем повышении температуры активность обоих образцов достоверно снижается: при 80°C активность коммерческой фосфолипазы С ниже значений, полученных при 60°C, в 1.6 раза, а полученной нами рекомбинантной PLC в 2.1 раза. Фосфолипазная активность рекомбинантного фермента при культивировании в колбах оказалась ниже, чем при наработке в ферментерах, что объясняется разницей в условиях культивирования: дополнительная аэрация в ферментерах, поддержание уровня рН на задаваемом уровне, питательные среды и их компоненты.

Влияние температуры хранения и консервантов на органолептические свойства и активность препарата

При оценке органолептических свойств препарата по истечении 30 сут установлено, что темно-коричневый цвет всех образцов сохранялся на протяжении всего периода хранения, характерный специфичный бацильный запах, присутствующий во всех образцах, более выражен у хранившихся при +25°C. В пробах без добавления консервантов вне зависимости от температуры хранения формировался осадок, отсутствующий в вариантах с консервантами.

Результаты, полученные при изучении влияния температуры хранения и различных консер-

Таблица 1. Усредненные показатели ферментации штамма *B. mojavensis* BDV-1/PLC6H в 15 и 250 л биореакторе
Table 1. Average fermentation rates of the *B. mojavensis* BDV-1/PLC6H strain in 15 and 250 L bioreactors

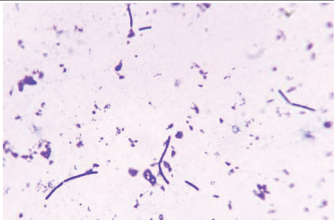
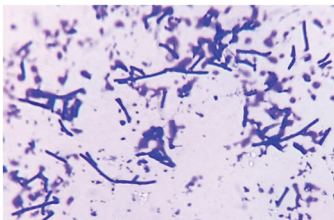
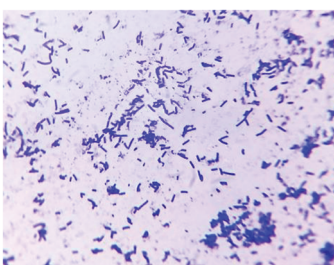
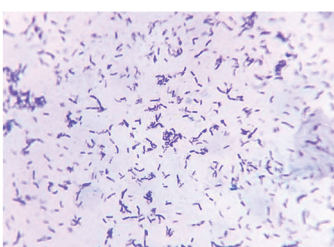
| Время культивирования, ч | Микроскопия | Оптическая плотность | pH |
|--------------------------|---|----------------------|-----------------|
| 2 |  | 0.397 ± 0.044 | 6.84 ± 0.01 |
| 4 |  | 0.566 ± 0.035 | 6.68 ± 0.18 |
| 6 |  | 0.960 ± 0.085 | 6.40 ± 0.59 |
| 24 |  | 1.406 ± 0.168 | 8.37 ± 0.77 |

Таблица 2. Динамика фосфолипазной активности образцов культуральной жидкости при наработке в биореакторах разного объема
Table 2. Dynamics of Phospholipase activity of cultural fluid samples during production in bioreactors of different volumes

| Активность фермента, ед.акт./мл | Время культивирования в ферментере, ч | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 4 | 7 | 8 | 13 | 14 | 15 | 24 |
| Ферментер 15 л | 184.41 ± 61.47 | 305.07 ± 12.04 | 307.35 ± 34.15 | 259.54 ± 12.98 | 191.24 ± 20.87 | 136.60 ± 40.98 | 100.17 ± 32.83 |
| Ферментер 250 л | 161.2 ± 34.2 | 167.1 ± 21.9 | — | 248.2 ± 27.5 | 151.6 ± 20.2 | 143.9 ± 9.9 | 140.7 ± 3.7 |

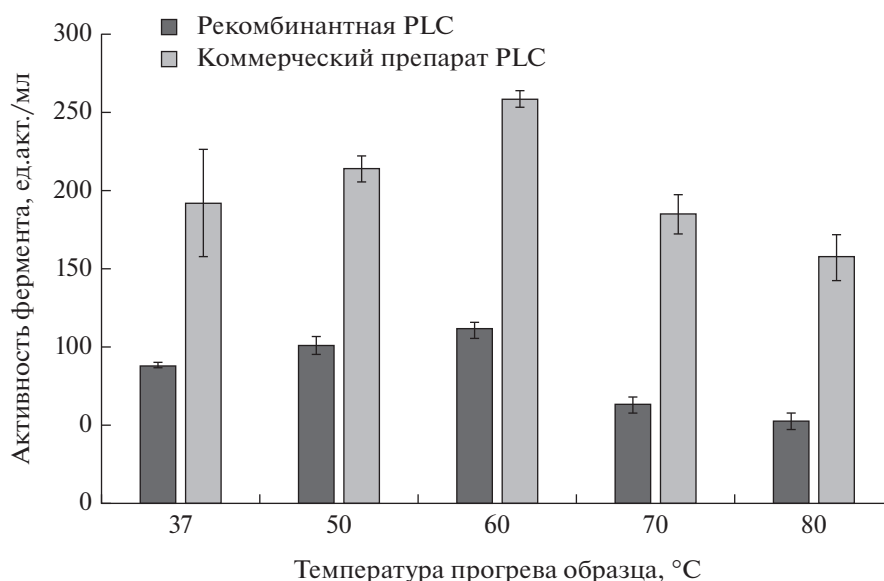


Рис. 2. Изменения активности фосфолипазы С (ед. акт./мл) в зависимости от температуры предварительного прогрева фермента в сравнении с коммерческим препаратом Phospholipase C *Bacillus cereus* (“Sigma-Aldrich”, Израиль).
Fig. 2. Changes in the activity of Phospholipase C (u.a./mL) depending on the temperature of the preheating of the enzyme in comparison with the commercial preparation Phospholipase C *Bacillus cereus*.

вантов на активность фермента, представлены в табл. 3

У образца без консервантов активность через 30 сут достоверно не изменилась относительно первоначального значения независимо от температуры хранения и осталась на более высоком уровне, чем в образцах с консервантами. Отрицательное влияние на активность фермента оказало сочетание консервантов: хлорид натрия (10%) + бензоат натрия (0.2%) + сорбат калия (0.3%). При этом температура хранения принципиально не повлияла на показатели фосфолипазной активности.

Таким образом, в результате опытно-промышленной наработки с использованием штамма-продуцента *B. mojavensis* BDV-1/PLC6H получен ферментный препарат рекомбинантной фосфолипазы С, характеризующийся максимальной активностью 307.35 ед. акт./мл, температурным оптимумом 60°C и термостабильностью на уровне

коммерческого препарата фосфолипазы из *Bacillus cereus*, способный сохранять свою активность без добавления консервантов при комнатной температуре в течение месяца. Полученный фермент уже на этапе надосадочной жидкости имеет высокие показатели активности и термостабильности, что, учитывая короткий цикл ферментации, делает его перспективным образцом для дальнейшей биотехнологической цепочки (очистка, концентрирование, сушка) с целью получения высокоэффективного отечественного препарата фосфолипазы С.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Управления Алтайского края по пищевой, перерабатывающей, фармацевтической промышленности и биотехнологиям.

Таблица 3. Активность рекомбинантной фосфолипазы С разных условиях хранения
Table 3. Activity of recombinant Phospholipase C with different storage conditions

| Консервант | Активность фосфолипазы С, ед. акт./мл | | |
|---|---------------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | первые сутки наработки | через 30 сут хранения | |
| | | при $t+4^{\circ}\text{C}$ | при $t+25^{\circ}\text{C}$ |
| Контроль | | 204.90 ± 13.66 | 218.56 ± 41.73 |
| Глицерин | 217.94 ± 6.59 | 163.92 ± 8.20 | 136.60 ± 27.32 |
| Хлорид натрия + бензоат натрия | | 136.60 ± 6.83 | 163.92 ± 8.20 |
| Хлорид натрия + бензоат натрия + сорбат калия | | — | 95.62 ± 40.98 |

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dos Passos R.M., Silva R.M., Pontes P.V. de A., Morgano M.A., Meirelles A.J.A., Stevens Ch.V., Ferreira M.C., Sampaio K.A. Phospholipase cocktail: A new degumming technique for crude soybean. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2022, 159, 113197. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113197>
2. Val D.S., Marchiso F., Nardo L.Di., Peirú S., Aguirre A., Abriata L.A., Palacios L.E., Rasia R.M., Castelli M.E., Menzella H.G. Sustainable Refining of Vegetable Oil Made Easy with a Designer Phospholipase C Enzyme. *J. Agric. Food Chem.* 2023, 159(13), 5275–5282. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c09176>
3. Merkulyeva Y.A., Shcherbakov D.N., Sharlaeva E.A., Chirkova V.Y. Phospholipases c from the genus *Bacillus*: biological role, properties, and fields of application. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2021, 47(3), 653–659. <https://doi.org/10.1134/S1068162021030134>
4. Синецкий С.П., Борщевская Л.Н., Соболевская Т.И., Калинина А.Н., Патрушева Е.В. Рекомбинантный штамм бактерий *Bacillus subtilis* – продуцент фосфолипазы С: RU 2500811: опубл. 10.12.2013 Бюл. № 34.
5. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
6. Kurioka S., Matsuda M. Phospholipase C assay using p-Nitrophenylphosphorylcholine together with sorbitol and its application to studying the metal and detergent requirement of the enzyme. *Anal. Biochem.*, 1976, 75(1), 281–289. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90078-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90078-6)

Evaluation of the Enzymatic Activity of Recombinant Phospholipase C Obtained by *Bacillus mojavensis* Submerged Cultivation in Pilot Fermenters

V. Yu. Chirkova^{a, #}, D. N. Shcherbakov^{a, b}, E. A. Sharlaeva^a, M. V. Shirmanov^a, P. V. Kolosov^a, E. A. Kolosova^{a, b}, A. N. Irkitova^a, A. V. Malkova^a, D. E. Dudnik^a, E. N. Kargashilova^a, and I. Yu. Evdokimov^a

^aAltai State University, Barnaul, 656049 Russia

^bState Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Rosпотребнадзор, Koltsovo, 630559 Russia

[#]e-mail: varvara.chirkova@gmail.com

Abstract—Phospholipase C is an enzyme of the hydrolase class that catalyzes the cleavage of phospholipids to diacylglycerides and polar phosphate-containing groups. This enzyme is promising for use in various fields: refining oils, obtaining biodiesel fuel, accelerating the ripening of cheeses, as an emulsifier, etc. In this study, experimental submerged cultivation of a new *Bacillus mojavensis* strain producing recombinant phospholipase C in pilot (semi-industrial) fermenters of various sizes was carried out. As a result of cultivation in a 15-liter bioreactor at 37°C for 8 h, an enzyme preparation was obtained with a maximum phospholipase activity of 307.35 U/mL and a temperature optimum of 60°C, capable of retaining its activity for a month at room temperature without the addition of preservatives.

Keywords: activity, *Bacillus mojavensis*, cultivation, recombinant enzymes, phospholipase C, fermentation