

**АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ**

На правах рукописи
УДК 547.962.944.945

ХАДЖИЕВ ДИЛМУРОД ДИЛЬШАДОВИЧ

**Выделение, очистка и свойства
глюкозооксидазы из *Aspergillus niger***

03.00.04-Биохимия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ташкент – 2009

Работа выполнена на кафедре биохимии Ташкентской медицинской академии и институте биоорганической химии АН РУз.

Научный руководитель доктор медицинских наук, профессор
САБИРОВА Рихси Абдукадыровна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
ХОДЖИМЕТОВ Абдугаффар Ахатович

доктор биологических наук, профессор
РАХИМОВ Мирзаатхам Мирзакаримович

Ведущая организация Ташкентский педиатрический медицинский
институт

Защита состоится «_____» _____ 2009 г. в _____ час. на заседании Специализированного совета Д 015.16.01 при Институте биохимии АН РУз по адресу: 100125, Ташкент, ул. Х. Абдуллаева, 56.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биохимии АН РУз.

Автореферат разослан «_____» _____ 2009 г.

Ученый секретарь

**Специализированного совета,
кандидат биологических наук**

Г. У. Усманова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Глюкоза играет большую роль в организме, поэтому большинство клинических исследований основано на определении её концентрации в биологических жидкостях. Нарушение углеводного обмена наблюдается достаточно часто, особенно при диабете, которым в мире страдает 120 млн. человек.

Медицинская терапия этой патологии заключается в регулировании уровня глюкозы и приближении его к значениям здоровых людей. Результаты исследовательских программ Diabetes Control and Complications Trial (США 1993г.), UK Prospective Diabetes Study (Великобритания, 1998г.) показали, что основной целью лечения должно быть достижение нормального или почти нормального уровня глюкозы (усиленная инсулинотерапия для инсулинзависимых диабетических больных). А этот процесс требует частого определения уровня глюкозы в крови.

Начиная с открытия инсулина и применения его в практическом здравоохранении, больной с самоконтролем представляет самое большое продвижение терапии диабета. Глюкозу в плазме крови определяют с помощью специальных тест-наборов.

Степень изученности проблемы. Тест-наборы для определения концентрации глюкозы, включающие ферментные системы, в нашу Республику поставляют различные иностранные фирмы. Для изготовления этих наборов разработаны различные методы и наиболее оптимальные условия выделения глюкозооксидазы из различных биологических объектов (Еремин А.Н. с соавт., 2006; Сухачев М.В. с соавт. 2004), установлены факторы влияющие на их свойства (Будников Л.П. с соавт. 2007; Михайлова Р.В. с соавт. 2007; Godjevargova T. et. all. 2000). Однако отечественных тест наборов еще не разработано, поскольку отсутствуют методы, позволяющие получить ферменты для количественного определения содержания глюкозы в крови.

Связь диссертационной работы с тематическими планами НИР. Работа выполнена по плану НИР Ташкентской медицинской академии и Института биоорганической химии АН РУз (ГНТП-15 №П-15.39; ИДФ – 7).

Цель исследования: разработать методы выделения, очистки глюкозооксидазы из *Aspergillus niger*, изучить её свойства и сравнить информативность данной методики с существующими.

Задачи исследования:

1. Разработать метод выделения глюкозооксидазы из различных штаммов мицелия гриба *Aspergillus niger*.
2. Разработать наиболее совершенные методы очистки выделенной глюкозооксидазы.
3. Получить антитела к выделенной глюкозооксидазе.
4. Сравнить эффективность использования глюкозооксидазы, выделенной из *Aspergillus Niger*, с существующими методами определения глюкозы в крови.

Объект и предмет исследования. В качестве объекта исследований использовали штаммы грибов: *Aspergillus* (*A.fumigatus*, *A.yavanicus*, *A.flavus*, *A.oryzae*, *A.ochraceus*, *A.niger*, *A.terreus*, *A.nidulans*, *A.terreus*), *Penicillium*. Sp. (11 штаммов), *Verticillium* (4 штамма), *Acremonium* (8 штаммов) и *Fusarium* (6 штаммов), предоставленные Институтом микробиологии и Институтом биоорганической химии АН РУз.

Методы исследований. Использованы методы фракционирования белковых смесей и изучения физико-химических свойств белков, первичной селекции штаммов микроорганизмов, а также иммунологические, статистические методы.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Штаммы *Aspergillus niger* 91, 47, 32/1 и *Penicillium Sp* 26 оказались наиболее активными для производства глюкозооксидазы. Дальнейшее исследование проводили со штаммом *Aspergillus niger* 32/1. Оптимальной культуральной средой явился состав, содержащий 50 г/л глюкозы, 3 - мочевины, 40 - карбоната кальция, 6 г/л однозамещенного фосфата калия. Оптимальное время культивирования составило 22 час.

2. При гель- и ионообменной хроматографии наиболее активной является фракция G-3-10. Наибольшие специфическая активность глюкозооксидазы и степень очистки установлены во фракции, полученной ионообменной хроматографией. Первоначальная активность фермента при 25⁰С не меняется в диапазоне рН 6,0 - 8,6, 30⁰С – достигает максимума, а дальнейшее повышение температуры (до 55⁰С) активность падает, но не больше, чем на 20%.

3. Иммуноаффинная хроматография позволяет выделить глюкозооксидазу, обладающую высокой специфической активностью и степенью очистки. На основе выделенного фермента создан тест-набор для определения глюкозы в биологических жидкостях.

Научная новизна. Впервые в Республике Узбекистан выделена глюкозооксидаза из мицелия гриба *Aspergillus niger*, необходимая для производства тест-наборов, контролирующих содержание глюкозы в биологических жидкостях и изучены ее свойства. Установлена эффективность применения данного фермента для количественного определения глюкозы.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Из мицелия гриба *Aspergillus niger* выделена высокоочищенная глюкозооксидаза. Получены антитела к глюкозооксидазе и создана аффинная колонка, которая позволила выделить данный фермент за один этап. Создан тест-набор «БиоГлюкоФен» для определения глюкозы в биологических жидкостях.

Реализация результатов. Полученные результаты расширяют имеющиеся представления о выделении, очистке и изучению свойств ферментов, помогут создать отечественные наборы для определения глюкозы в биологических жидкостях.

Материалы диссертации используются в учебном процессе на кафедрах биологической химии, патофизиологии ТМА.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены научно-практической конференции аспирантов, соискателей и резидентов «Дни молодых ученых» (Ташкент, 2006), научно-практической конференции «Современные проблемы биохимии и эндокринологии» (Ташкент, 2006), научно-практической конференции «Ёш тиббиёт олимлари куни» (Ташкент, 2008), на межкафедральной конференции с участием кафедр биоорганической и биологической химии медико-педагогического и стоматологического факультетов, патофизиологии, нормальной физиологии, фармакологии ТМА (Ташкент, 2009г.), научном семинаре Специализированного совета Д 015.16.01 при Институте биохимии АН РУз (Ташкент, 2009г.).

Опубликованность результатов. По теме диссертационной работы опубликовано 5 работ, в том числе 2 журнальные статьи.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 111 страницах компьютерного текста. Состоит из введения, обзора публикаций, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения, заключения, выводов, иллюстрации: 7 таблицам, 22 рисунка. Библиографический указатель включает 168 отечественных и зарубежных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы исследований

Объектом исследования служили штаммы грибов *Aspergillus* (*A.fumigatus*, *A.yavanicus*, *A.flavus*, *A.oryzae*, *A.ochraceus*, *A.niger*, *A.terreus*, *A.nidulans*, *A.terreus*), *Penicillium*. Sp. (11 штаммов), *Verticillium* (4 штамма), *Acremonium* (8 штаммов) и *Fusarium* (6 штаммов). Известно (Wilson R., Turner A., 1992), что наиболее активными продуцентами глюкозооксидазы являются мицелиарные грибы родов *Aspergillus* и *Penicillium*. Поэтому на первом этапе мы изучили большое число штаммов этих грибов на способность производить глюкозооксидазу. Скрининг проводили на плашках. Штаммы, активные в производстве глюкозооксидазы, определяли методом J.Fiedurek et all. (1997), по величине зоны диффузии фермента (мм в диаметре), секретлируемого в чашках Петри, залитых агаровым слоем.

Гель-фильтрацию штаммов на сефадексах осуществляли по рекомендациям фирмы Pharmacia. Суспензией сефадексов заполняли стандартные колонки (LKB) и уравнивали их в течение суток 0,005 М аммоний-ацетатным буфером (pH 7,6). Исследуемый материал наносили на колонку с гелем под слой жидкости. Элюирование проводили уравнивающим буфером со скоростью 30 мл/ч.

Электрофорез штаммов проводили на 7%-ом полиакриламидном геле с использованием кислых и щелочных буферных систем. Молекулярную массу и число полипептидных цепей в молекуле определяли с помощью электрофореза в 10%-ом полиакриламидном геле в присутствии ДДС-Na (Witteveen C. F. B., Veenhuis M., Visser J. 1992).

Электрофоретическому разделению подвергали белок до и после восстановления в нем S-S-связей. Для определения молекулярной массы использовали сефадекс G-200. Колонку калибровали цитохромом С, рибонуклеазой, трипсином, химотрипсином, альбумином, декстраном голубым, миозином. Элюентом служил 0,05 М Трис-НСI рН 7,5, содержащий 0,2 М КСI. Скорость элюции 30 мл/ч. Молекулярную массу определяли по объему жидкости, прошедшей через колонку до появления середины «пика» белка, в соответствии с показателями на калибровочной кривой. Основным вопросом является проблема масштабирования культуры. Для роста культуры родов *Penicillium* используется поверхностный метод культивирования, что требует значительных финансовых вложений и специально оборудованной стерильной комнаты, довольно большого размера. Исходя из этих соображений, а также учитывая высокую активность глюкозооксидазы, в дальнейшем мы решили использовать культуру *Aspergillus niger* штамм 32/1.

Из мицелия гриба *Aspergillus Niger* (получали из испорченных плодов томатов) выделяли глюкозооксидазу в холодной комнате при температуре 4⁰С. Мицелий измельчали под действием жидкого азота в фарфоровой ступке в минимальном объеме 0,1М К₂НРО₄. После оттаивания – центрифугировали при 20000 g в течение 30 мин. В гомогенат добавляли сухой сульфат аммония до 90%-ного насыщения и выдерживали 18 час. при 4⁰С. Осадок был собран центрифугированием, растворяли его в минимальном объеме 0,05М Tris/НСI, диализовали в 0,05М Tris/НСI, рН 8,0, который содержался 0,1М КСI и снова проводили через центрифугу. Супернатант, названный Dee-О-концентратом, обычно содержал 100% суммарной глюкозооксидазной активности.

Далее Dee-О-концентрат диализовали в 0,005М Na-ацетатном буферном растворе с рН 4,5, что позволяло удалить большое количество электролитов. Коричневый белок, образующийся при диализе, удаляли центрифугированием.

Супернатант, содержащий глюкозооксидазную активность, наносили на колонку с Amberlite CG-50 (50x 6 см), уравновешенной натрий-ацетатным буфером с рН 4,5; 0,1 М. Колонку четырежды промывали этим же буферным раствором для удаления значительного количества примесных белков. На конечном этапе белок элюировали натрий-ацетатным буфером с рН 5,0; 0,1; М, осаждали сульфатом аммония до 90%-ного насыщения, центрифугировали, добавляли в 50 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера, с рН 6,0 и диализовали.

Диализат наносили на колонку с ДЕАЕ-TSK 650 М (2,5x30 см), уравновешенной этим же буфером, и 5-кратно ее промывали для удаления коричневого белка с каталазной активностью. На заключительном этапе колонку промывали 0,2 М фосфатным буферным раствором, рН 6,0. При этом элюировался белок желтого цвета, обладающий глюкозооксидазной активностью. Из него удаляли соль (на колонке с сефадексом G-50 coarse) и лиофильно высушивали.

Полученный белок является гомогенным с ММ 130 kDa, изоэлектрической точкой 4,5, с активностью ≥ 100 МЕ/мг белка; рН оптимум -

5,5, рН стабильность - 4,0-8,0, оптимум температуры 40°C. Его использовали для получения антител.

Концентрацию пероксидазы определяли спектрофотометрически по методу S.Ogana et ol (1979) или с использованием пиридингеохромогена [J.Falk, 1964] и рассчитывали по формуле Кутузова Г.Д. (1981). Объемную и весовую активности глюкозооксидазы определяли по следующей формуле:

$$\text{Объемная_активность (МЕ/мл)} = \frac{(\Delta A_s - \Delta A_o) \times 3,1(\text{мл}) \times df}{32,8 \times 1/2 \times 0,1(\text{мл})} = \Delta A \times 1,89 \times df, \quad (1)$$

$$\text{Весовая активность (МЕ/мг)} = (\text{МЕ/мл}) \times 1/C, \quad (2)$$

где:

- 32.8 - миллимолярная экстинкция красителя в условиях определения, см²/μМ;
- 1/2 - фактор, основанный на факте, что из 1 моля перекиси водорода получается 1/2 моля красителя;
- df - фактор разбавления;
- C - содержание глюкозооксидазы в образце, мг/мл.

Титр антител определяли методом двойной радиальной иммунодиффузии на агаровых пластинках методом Оухтерлони (Lee M. Y. et all, 1994). Простую радиальную иммунодиффузию осуществляли по Манчини. На ровную поверхность равномерным слоем наносили 3%-ный агаровый гель, содержащий антитела (при температуре 56°C). В геле вырезали лунки и заполняли их раствором антигена (1 мг/мл по 15 мкл). Молекулы антигена радиально диффундируют из лунки и, встретившись с антителами, образуют кольцо преципитации.

Количественный двухмерный иммунофорез осуществляли известным способом А.М Егорова и соавторами (1991).

Для иммобилизации глюкозооксидазы в 50 мг суспензии целлюлозы, окисленной в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере с рН 9,0, добавляли 2 мг предварительно диализованного против того же буфера глюкозооксидазы. Для восстановления непрореагировавших альдегидных групп целлюлозы полученный конъюгат обрабатывали 0,1 М раствором боргидрида натрия с 0,15 М раствором хлористого натрия. Иммобилизованной глюкозооксидазой иммунизировали кроликов: многоточечное подкожное введение в область спины (1 мл в течение 4 месяцев с интервалом в 15 дней).

После месячного перерыва при реиммунизации вводили 1 мл смеси токсических фракций, содержащей 50-100 мг белка. Через 7, 9 и 11 суток проводили забор крови. Эффективность полученной антисывороток анализировали определением титра методом двойной радиальной иммунодиффузии по Оухтерлони с экстрактом мицелия *A.niger*.

Статистические методы. Результаты обрабатывали методом вариационной статистики. Определяли среднюю статистическую величину М, среднеквадратическое отклонение, ошибку средней *m* и коэффициент корреляции *r* вычисляли на компьютере типа IBM на базе процессора Pentium-IV с использованием пакета прикладных статистических программ «Excel» версия 7,0. Достоверность различий между выборками оценивали методами

вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента (t) для парных независимых выработок. Достоверной считалась разница значений при $p < 0,05$ (95%-ный уровень достоверности).

Основные результаты исследований и их обсуждение

Результаты скрининга способности культур грибов производить глюкозооксидазу показали (табл.1), что наиболее активными штаммами оказались *Aspergillus niger* 91, 47 и 32/1 и *Penicillium Sp* 26.

Таблица 1

Скрининг культур грибов на способность производить глюкозооксидазу

Вид гриба	Число протестированных штаммов	Глюкозооксидазная активность, мм	Номера активных штаммов
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10	2±0,2	36
<i>Aspergillus yavanicus</i>	12	0	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	10	0	-
<i>Aspergillus. niger</i>	14	5±0,001	91, 47
<i>Aspergillus terreus</i>	13	0	
<i>Aspergillus nidulans</i>	12	0	
<i>Penicillium Sp</i>	11	14±0,01	26
<i>Acremonium</i>	8	0	-
<i>Verticillium</i>	14	0	-
<i>Fusarium</i>	16	0	-
<i>A.niger</i>	10	60±0,2	32/1
<i>A.flavus</i>	8	0	-
<i>A.ochraces</i>	8	0	-

Примечание: Все грибы предоставлены Институтом микробиологии, *Aspergillus niger* – институтом биоорганической химии АН РУз.

Помимо генетических факторов на функционирование живого организма огромное влияние оказывает и окружающая среда. Для микроорганизмов факторами влияния являются температура культивирования, состав питательной среды, условия аэрации для аэробных организмов, pH и т.д. [Алиханян С.И., 1968]. Поэтому на следующем этапе мы определяли условия культивирования *Aspergillus niger* 32/1, для максимального выхода глюкозооксидазы. Все эксперименты дублировали.

Культуральную среду со штаммом ферментировали в различные периоды с различным уровнем субстратов, pH, мочевины (источник азота), карбоната кальция (CaCO_3), сульфата магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и однозамещенного фосфата калия (KH_2PO_4 .) Эксперименты проводили таким образом, чтобы параметр,

оптимизированный в одном эксперименте, был поддержан в последующих опытах [Алиханян С.И., 1968] при температуре 30°C.

Для оптимизации условий ферментации культуральная среда с 5%-ным содержанием глюкозы была термостатирована при 30°C и различных значениях рН. Через 15 час. инкубации активность глюкозооксидазы составляла $0,42 \pm 0,01$ Ед/мг белка. Через 18 и 21 час. – она увеличилась в 2,9 и 3,6 раза ($1,2 \pm 0,01$ и $1,5 \pm 0,02$ Ед/мг белка, соответственно) по сравнению с 15-часовой инкубацией. Максимальная активность глюкозооксидазы ($2,76 \pm 0,28$ Ед/мг белка) была достигнута после 22 часов инкубации (рис.1). В мицелиях, собранных после 48-часовой инкубации, активность глюкозооксидазы снизилась до $0,83 \pm 0,02$ Ед/мг белка, а после 72 часов – почти была равна нулю ($0,016 \pm 0,001$ Ед/мг белка). Полученные результаты согласуются с данными других исследователей (Willis, A.W., 1966), которые показали возрастание уровня глюкозооксидазы в период 12 – 36 час инкубации с последующим его уменьшением.

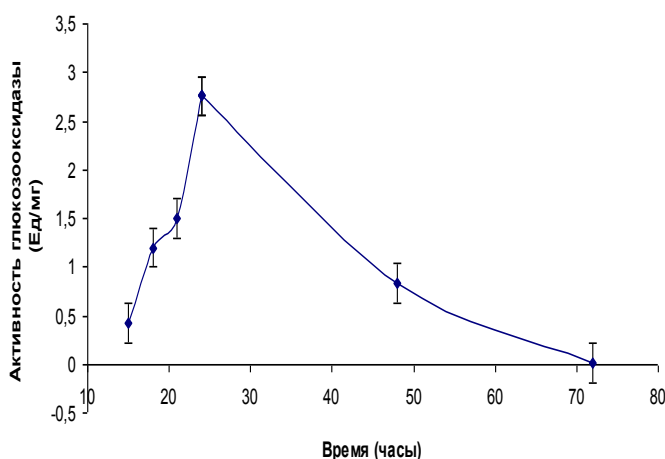


Рис.1. Влияние времени культивирования на активность глюкозооксидазы

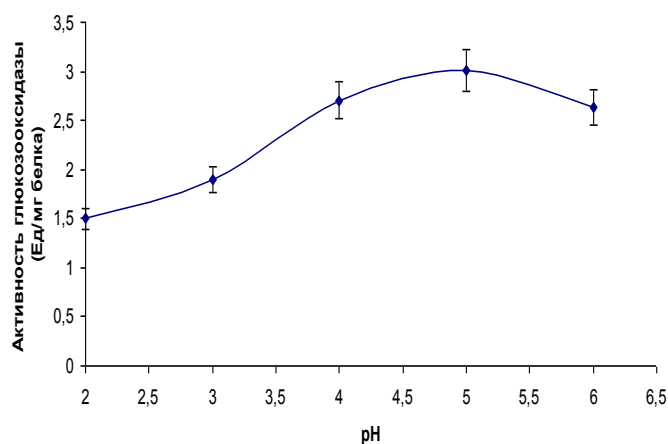


Рис.2. Влияние pH на активность глюкозооксидазы

Таким образом, 22-часовая инкубация оказалась оптимальной для культивирования мицелия.

Для определения влияния pH на синтез глюкозооксидазы культивирование проводили при различных значениях pH среды. Для роста культуры использовали основную культуральную среду, pH увеличивали фосфорной кислотой. Мы установили, что интенсивность образования глюкозооксидазы увеличивается при снижении pH, и достигая максимума при pH 5,0 (рис.2). Дальнейшее повышение кислотности отрицательно действует на активность фермента – она снижается на 12,6% ($2,63 \pm 0,02$). Это согласуются с исследованиями Rando et all (1976), показавшими оптимальное значение pH для *Penicillium pinophilum* равное 4,6.

Концентрация мочевины (источника азота) в культуральной среде значительно влияет на синтез глюкозооксидазы. Ее увеличение повышает активность глюкозооксидазы. При 0,2%-ной концентрации мочевины активность глюкозооксидазы повышается на 20,3% от исходной, а ее

максимальная активизация ($4,66 \pm 0,50$ ЕД/мг белка) достигается при 0,3%-ной концентрации (рис.3). Дальнейшее увеличение концентрации снижает активность глюкозооксидазы ($4,35 \pm 0,03$ ЕД/мг белка).

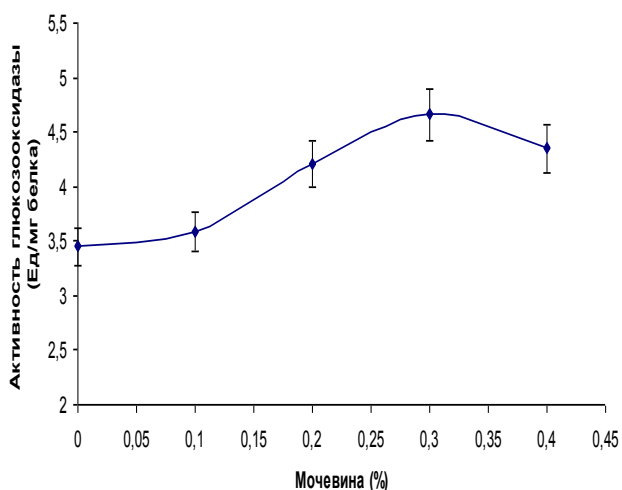


Рис. 3. Влияние мочевины на активность глюкозооксидазы

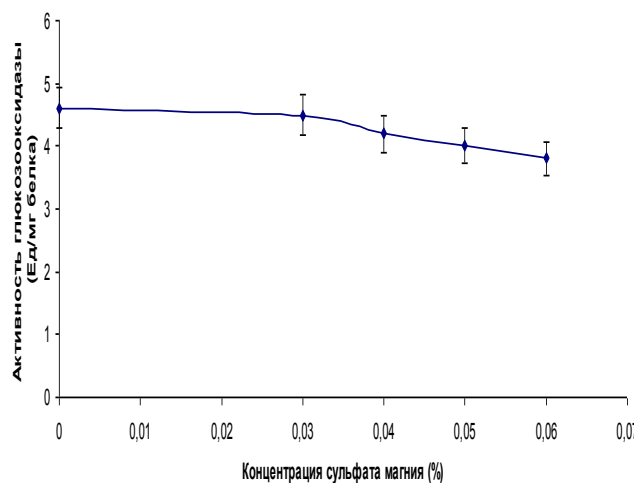


Рис.4. Влияние сульфата магния на активность глюкозооксидазы

Таким образом, 0,3%-ная концентрация мочевины является оптимальной для производства глюкозооксидазы.

Исследуя зависимость синтеза глюкозооксидазы от содержания сульфата магния, мы установили, что его увеличение в культуральной среде (5%-ная глюкоза, 0,3%-ная мочевина при 37°C и pH 5,0) снижает активность фермента (рис 4). Эти результаты соответствуют данным Lu T.V. et all. (1996).

Таким образом, увеличение концентрации сульфата магния снижает активность глюкозооксидазы. Поэтому в дальнейших исследованиях сульфат магния в культуральную среду не добавляли.

Эффект действия карбоната кальция в культуральной среде также изучали в четырех разных его концентрациях (рис.5).

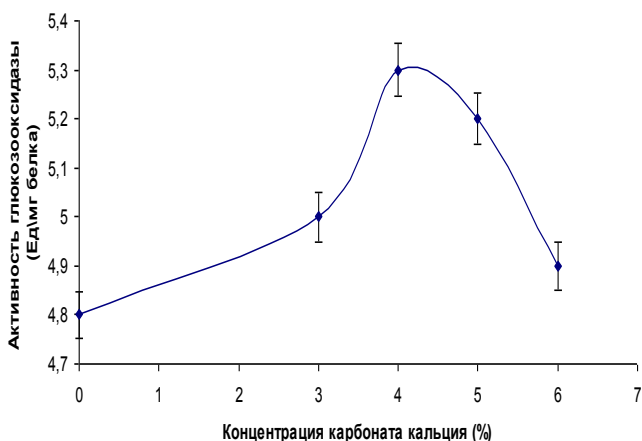


Рис.5. Влияние карбоната кальция на активность глюкозооксидазы

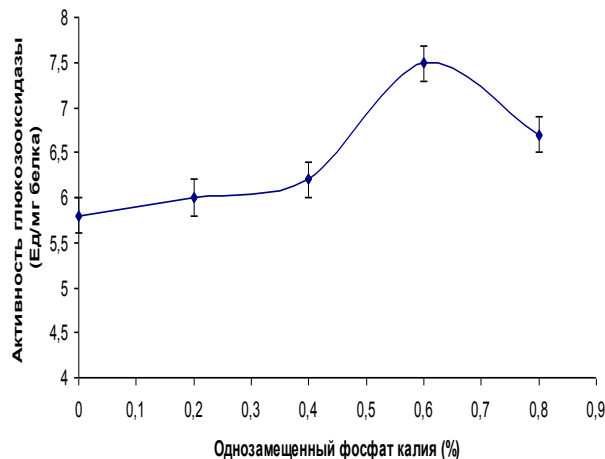


Рис.6. Влияние однозамещенного фосфата калия на активность глюкозооксидазы

Результаты показали, что добавление CaCO_3 в среду роста увеличивало производство фермента. Максимальное его значение ($5,57 \pm 0,58$ Ед/мг белка) было получено при 4%-ном растворе этой соли; 5 и 6%-ная концентрация снижала выработку глюкозооксидазы на 6,7 и 12,1%, соответственно, от максимальной ($5,2 \pm 0,01$; $4,9 \pm 0,02$ Ед/мг белка). Такие же результаты были получены Hatzinikolaou D. G., Macris V. J. (1995), которые установили, что CaCO_3 является особенно сильным индуктором глюкозооксидазы.

Исследуя зависимость выработки глюкозооксидазы от содержания однозамещенного фосфата калия, мы установили максимальную активность фермента при 6%-ном KH_2PO_4 - $7,49 \pm 0,28$ Ед/мг белка (рис.6). Это на 20,8% выше, чем при его нулевой концентрации KH_2PO_4 .

Таким образом, наиболее оптимальной средой для производства глюкозооксидазы штаммом *Aspergillus Niger 32/1* является следующий состав: глюкоза – 50 г/л, мочевины – 3, CaCO_3 – 40, KH_2PO_4 – 6 г/л. Оптимальное время культивирования - 22 час. При соблюдении этих условий активность глюкозооксидазы повышается в 2,7 раза.

Все эксперименты по выделению глюкозооксидазы, описанные ниже, были выполнены при температуре между 3-6°C. Культура *A.Niger* была выращена в течение 22 часов при 30°C в 2 л плоскодонной колбе, содержащей 1 л среды на ротационном шейкере при 140 оборотах в мин и собрана центрифугированием при 3000g в течение 20 мин. Собранные мицелии были промыты дважды холодным 50 мМ Tris/HCl буфером (pH 7,0), заморожены жидким азотом и разрушены в фарфоровой ступке с кварцевым песком и оставлены на 18 часов при 4°C. По истечении данного времени неразрушенные клетки и клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 12000g в течение 30 мин. Супернатант профильтрован через 0,22 мкм фильтр *Millipor* (США) и осаждали 90% от насыщения сульфатом аммония. По истечении 18 часов осадок фермента отделен центрифугированием при 12000g в течение 30 мин и отдиализован против 50 мМ Tris/HCl буфером (pH 7,0). Диализат был сконцентрирован ультрафильтрацией на ультрафильтрационной ячейке *Sartorius* (США), на мембране с пределом исключения 30000 Да и нанесена на колонку 2,6x90 см с *Sephacryl S-200* (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция) уравновешенной тем же буфером.

Скорость элюции составляла 60 мл/ч. Отбирались фракции по 6 мл. Наиболее активной фракцией была фракция G-3. Фракции с наибольшей глюкозооксидазной активностью были объединены на колонку 2x20 см с *DEAE-Macroprep* уравновешенной 50 мМ Tris/HCl буфером (pH 7,0) для проведения ионообменной хроматографии. Белки были элюированы линейным градиентом NaCl от 0 до 1,0М. Наиболее активной была фракция G-3-10. Фермент был очищен в 79,3 раза, с активностью 245,8 Ед/мг с выходом 9,5%. (табл.2).

Таблица 2

Этапы выделения глюкозооксидазы из мицелия гриба
Aspergillus Niger 32/1

Фракция	Специфическая активность глюкозооксидазы*, Ед/мг	Общее содержание белка, мг	Общая активность, Ед	Выход, %	Степень очистки
Грубый экстракт мицелия	3,1±0,2	285±20	883±50	100	1,0
Осаждение 90% (NH ₄) ₂ SO ₄	6,4±0,35	135±10	861±74	97,5	2,05
Гель-фильтрация на <i>Sephacryl S-200</i>	11,7±0,9	31±1,48	363±33	41,1	3,76
Ионообменная хроматография на <i>DEAE-Macroprep</i>	245,8±24,3	0,34±0,02	83,9±4,2	9,5	79,3

Примечание. * - одна международная единица окисляет 1 мкМ 0-дианизидина за мин при 25°C и рН 7,0.

Этапы выделения влияют на специфическую активность глюкозооксидазы, общее содержание белка, общую активность и степень очистки. Грубый экстракт мицелия имеет наименьшую специфическую активность глюкозооксидазы; при осаждении 90%-ным сульфатом аммония и при гель-фильтрации ее специфическая активность повышается 2,1 и 3,8 раза, соответственно, по сравнению с грубым экстрактом. Наибольшая специфическая активность глюкозооксидазы установлена после ионообменной хроматографии - почти в 80 раз выше, чем в грубом экстракте. Общее содержание белков в различных фракциях также резко отличается: разница между показателями грубого экстракта и ионообменной хроматографии составляет более 800 раз. Также резко отличаются показатели степени очистки.

Молекулярную массу выделенной глюкозооксидазы определяли методом гель-фильтрации на колонке с *Sephacryl S-300*. Колонка была предварительно откалибрована белками (в скобках указана молекулярная масса): тироглобулином (670 000), гамма-глобулином (158 000), овальбумином (44 000), миоглобином (17 000), витамином В₁₂ (рис.7).

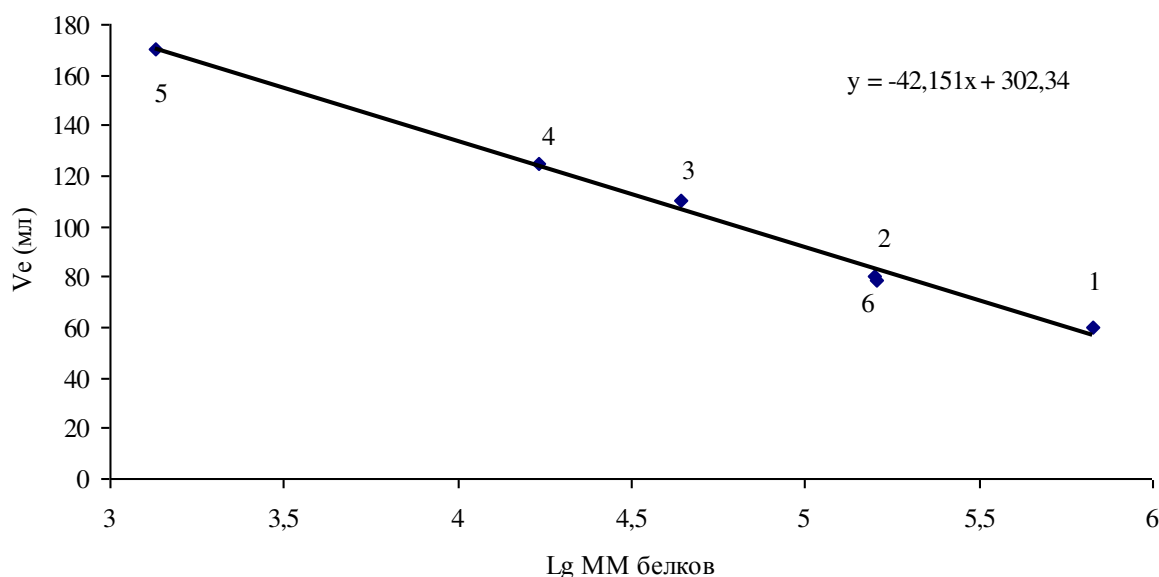


Рис. 7. Гель – фильтрация глюкозооксидазы. V_e – объем элюции белков, $LgMM$ - отложены молекулярная масса стандартных белков, по которым рассчитана ММ глюкозооксидазы. 1 – тироглобулин, 2- гамма-глобулин, 3 – овальбумин, 4 - миоглобин, 5 – витамин B₁₂ и 6 – глюкозооксидаза.

Молекулярная масса глюкозооксидазы из *A.Niger*, определенная гель–фильтрацией составила 160 ± 10 кДа.

На электрофорезе в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с 0,1%-ной ДДС–Na после обработки фермента β -меркаптэтанолом наблюдали одну полосу, подвижность которой соответствовала молекулярной массе 80 кДа. Видимо, фермент состоит из двух идентичных субъединиц.

Глюкозооксидаза из *A.Niger* характеризуется высокой субстратной специфичностью к D-глюкозе. Мы определили константу (K_m) Михаэлиса – Ментена: изменение скорости реакции окисления о-дианизидина в зависимости от концентрации субстрата. Для этой цели на определенные количества глюкозы действовали стандартным количеством фермента.

Значение K_m оказалось равным 5,48 мМ при рН 7,0 и температуре 25⁰С, а молекулярная масса – 160 000.

Далее мы исследовали физико-химические характеристики глюкозооксидазы (рН-стабильность, термостабильность). Оказались, что относительная активность глюкозооксидазы при 25⁰С и рН 4,0 составляла 40%. По мере снижения кислотности она повышалась (рис 8а) до 90%, но при рН 9,0 и 9,5 активность глюкозооксидазы резко снизилась до 82 и 20%, соответственно.

При температуре 25⁰С относительная активность фермента составила 80% (рис. 8б), при 30⁰С - 100%. Дальнейшее повышение температуры угнетало выработку глюкозооксидазы, особенно резко это происходило при 70 и 80⁰С – на 12 и 10% соответственно.

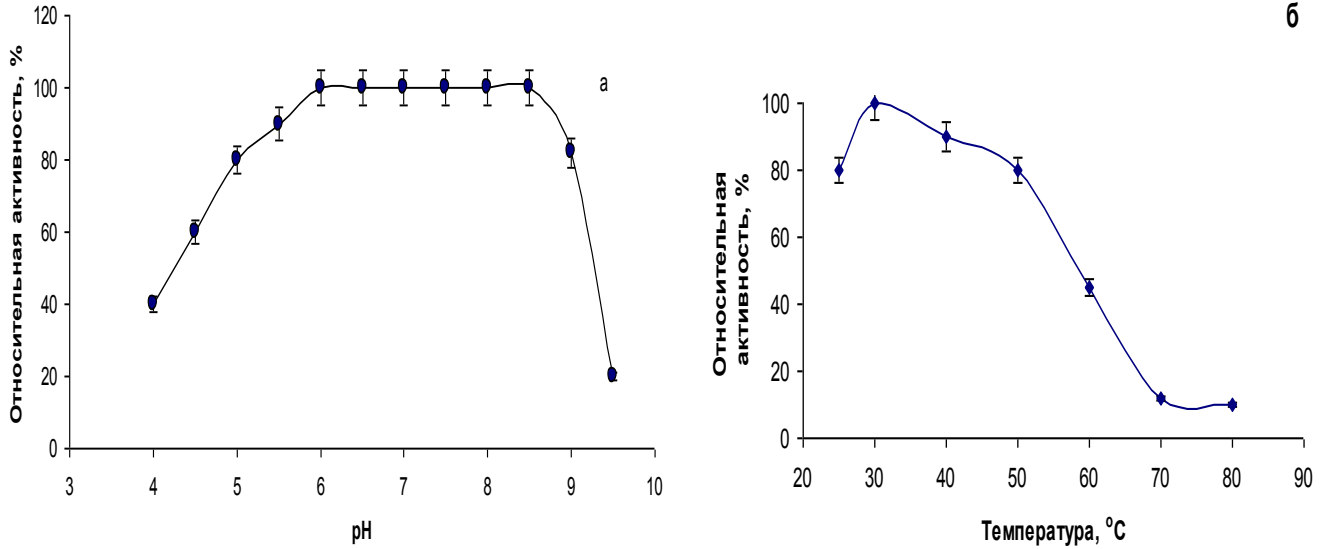


Рис. 8. Оптимум pH (а) и диапазон рабочей температуры (б) глюкозооксидазы из *Aspergillus Niger 32/1*

На следующем этапе мы изучили влияние pH на стабильность глюкозооксидазы из *Aspergillus Niger 32/1* в точке температурного оптимума. Результаты исследования показали, что при pH 3,0 относительная активность фермента составляет 40% (рис. 9). Инкубирование глюкозооксидазы при 30°C в течение 1 час не влияет на ее стабильность в диапазоне значений pH 4,0 - 8,6. Но pH 9,0 и 9,5 снижает относительную активность фермента до 95 и 81%, 40 и 18% соответственно.

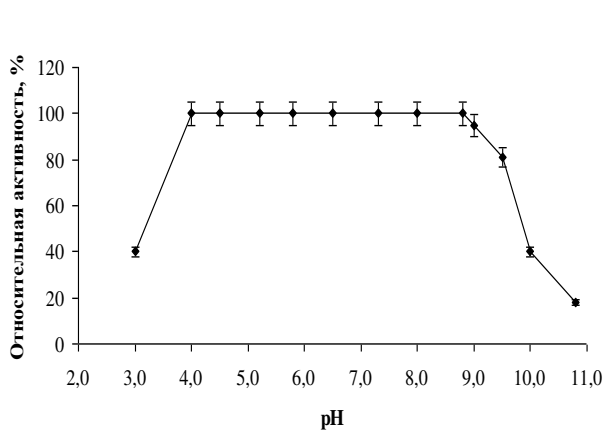


Рис.9. Влияние pH на стабильность глюкозооксидазы *A.Niger 32/1* в точке температурного оптимума

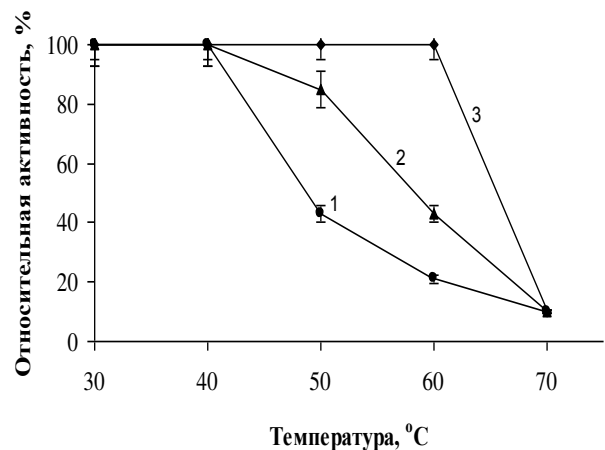


Рис. 10. Влияние температуры на стабильность глюкозооксидазы *A.Niger 32/1* при pH: 1 – 8,6; 2 – 7,0; 3 – 5,6.

Мы установили также, что изменение температуры влияет на относительную активность фермента при различных значениях pH (рис 10). При инкубировании в буфере с pH 5,6 фермент сохраняет первоначальную активность при 50°C в течение 1 час, а при 60°C – в течение 15 мин., тогда как при pH 8,6 и 7,0 его активность быстро падает. При значении pH 8,6 и температуре 50 и 60°C относительная активность фермента составляет 43 и 21%, соответственно; снижение же кислотности до 7,0 единиц увеличивает содержание фермента до 85 и 43%, соответственно. При всех исследованных значениях pH при 70°C относительная активность фермента наиболее низкая (10%).

Таким образом, 60-градусной температуре и pH 5,6 сохраняет 100%-ную активность.

После создания технологии моноклональных антител резко снизилась стоимость ферментных препаратов. Это объяснялось тем, что появилась возможность выделять физиологически активные вещества (главным образом белки) за одну стадию. Поэтому на следующем этапе нашей работы мы решили создать иммуноаффинную колонку с ковалентно пришитыми моноспецифичными поликлональными антителами к глюкозооксидазе из *Aspergillus Niger*. Для этой цели мы получили кроличью антисыворотку к глюкозооксидазе, выделенную с помощью хроматографических методов. После проведения полного цикла иммунизации была получена тотальная антисыворотка с высоким титром. Титр антител определяли методом двойной радиальной иммунодиффузии на агаровых пластинках методом Оухтерлони [1994]. При определении титра был установлен титр 1/128. Мы ее использовали для отделения иммуноглобулиновой фракции IgG, с помощью двукратного солевого осаждения сульфатом аммония (33% от насыщения).

В качестве носителя для иммуноаффинной колонки использовали пористые целлюлозные шарики (разработка Института биоорганической химии АН РУз).

На 20 мл активированного геля было пришито 50 мг глюкозооксидазы. После отмывки и забивки, остаточных оксирановых групп глицином данным сорбентом наполняли колонку емкостью 25 мл, на которую была нанесена смесь иммуноглобулинов и диализировали в 0,05М натрий – фосфатном буфере pH 6,8. После удаления несвязавшегося материала тем же буферным раствором специфические антитела элюировали 0,1М раствором уксусной кислоты пятикратно. В итоге получено 54 мг специфических антител к глюкозооксидазе, которые использовали для создания иммуноаффинной колонки к глюкозооксидазе. Ковалентное связывание проводили на BrCN-активированную агарозу. На 10 мл BrCN-активированной агарозы было пришито 35 мг глюкозооксидазы. Данный носитель использовали для выделения глюкозооксидазы из мицелия гриба *A.niger*.

При нанесении 100 мл экстракта мицелия с общим содержанием белка 110 мг и активностью глюкозооксидазы 349 Ед за один этап выделено 2,9 мг белка с выходом 23% и удельной активностью 233,6 Ед/мг белка (табл.3).

Выделение глюкозооксидазы из мицелия гриба *Aspergillus Niger 32/1* методом иммуноаффинной хроматографии

Фракция	Специфическая активность глюкозооксидазы*, Ед/мг	Общее содержание белка, мг	Общая активность, Ед	Выход, %	Степень очистки
Грубый экстракт мицелия	3,1±0,2	110,1±10	341±29	100	1,0
Аффинная хроматография	233,6±19,9	2,9±0,1	79,2±6,6	23,2	75,4

Таким образом, иммуноаффинная хроматография позволяет выделить глюкозооксидазу с высокой специфической активностью и степенью очистки. Полученный фермент был обессолен на колонке с сефадексом G-50 coarse и лиофильно высушен. Выделенный фермент в совокупности с пероксидазой был использован при создании тест-набора для определения глюкозы в биологических жидкостях глюкозооксидазным методом. За основу набора были приняты разработки Tsuge H. (1979), в соответствии с которым на один анализ в 4 мл кювете использовалось 40 МЕ глюкооксидазы и 4 МЕ пероксидазы; субстратами определения выделившейся пероксидазы служили фенол и 4-аминоантипирин. Весь анализ производили в 0,05М калий-фосфатном буфере с рН 6,8.

По результатам исследования был создан набор реагентов для определения глюкозы в сыворотке крови глюкозооксидазным методом - «БиоГлюкоФен». Мы сравнили действие и возможности нашей разработки с тест-наборами зарубежных фирм: Hospitex Diagnostics (Италия) и Cypres Diagnostics (Бельгия). Результаты сравнения показали, что действие отечественного препарата «БиоГлюкоФен», содержащий глюкозооксидазу, выделенную из *A.niger 32/1*, достоверно не отличается от наборов зарубежных фирм. Но наш тест-набор дешевле, чем импортные: экономия составляет 10-15 сум на каждый анализ. Выпуск и применение набора в медицинской практике разрешен Министерством здравоохранения Республики Узбекистан (регистрационное удостоверение №УзД 09/77/6 от 20 марта 2009 г.). Таким образом, «Биоглюкофен» может быть рекомендован для определения глюкозы в крови в клинических лабораториях Республики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования позволили сформулировать следующие

ВЫВОДЫ:

1. Среди исследованных штаммов грибов наилучшим продуцентом глюкозооксидазы является дикий штамм *Aspergillus Niger* 32/1, выделенный из испорченных плодов томатов.
2. Оптимальными условиями для выделения высокоактивной глюкозооксидазы из *Aspergillus Niger* 32/1 являются определенная культуральная среда (глюкоза-50мг, мочевины-3, карбонат кальция-40 и однозамещенный фосфат калия-6г/л) и 22-часовой цикл культивирования.
3. Наибольшая специфическая активность глюкозооксидазы и высокая степень очистки установлены во фракции, полученной с помощью ионообменной хроматографии. Первоначальная активность фермента при 25⁰С не меняется в диапазоне рН 6,0 - 8,6; 30⁰С - достигает максимума. Дальнейшее увеличение температуры снижает активность фермента не более чем на 20%.
4. Иммуноаффинная хроматография также позволяет выделить глюкозооксидазу с высокой специфической активностью и степенью очистки. Выделенный фермент может быть использован для создания тест-набора для определения глюкозы в биологических жидкостях.
5. На основе выделенной глюкозооксидазы создан отечественный тест-набор «БиоГлюкоФен». По информационным характеристикам он не отличается от зарубежных аналогов (Италия, Бельгия), но более экономичен (10-15 сум на каждом анализе), поэтому может быть рекомендован для применения в клинических лабораториях.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Хаджиев Д.Д. Выделение глюкозооксидазы из мицелия гриба *Aspergillus niger*. // Матер.научн.-практ.конф. аспирантов, соискателей и резидентов. // Дни молодых ученых. Ташкент.21-24 апрель 2006.-С.11.
2. Сабирова Р.А., Хаджиев Д.Д., Сагдиев Н.Ж. Использование суспензии окисленной целлюлозы для получения тотальной антисыворотки к глюкозооксидазе. // Матер.научн.-практ.конф. «Современные проблемы биохимии и эндокринологии». - Ташкент.-2006.-С.81. (Сабирова Р.А., Сагдиев Н.Ж.)
3. Хаджиев Д.Д. Выделение глюкозооксидазы из *Aspergillus niger*. // «Ёш тиббиёт олимлари куни» Илмий амалий конференцияси. Тошкент, 2008.-С.132-133.

4. Хаджиев Д.Д., Сагдиев Н.Ж., Сабирова Р.А. Выделение и характеристика глюкозооксидазы из *Aspergillus niger* 32/1. //Узб. биол. журнал. –Ташкент, 2008.-№3.-С.3-6. (Сабирова Р.А., Сагдиев Н.Ж.)
5. Хаджиев Д.Д., Кадряева Г.В., Кузнецова Н.Н., Сабирова Р.А., Сагдиев Н.Ж. Оптимизация параметров культивирования гриба *Aspergillus niger* 32/1 для получения глюкозооксидазы.//Докл. АН РУз.- Ташкент, 2008.-№5.-С.56-59. (Сабирова Р.А., Кадряева Г.В., Кузнецова Н.Н., Сагдиев Н.Ж.)

Считаю своим долгом выразить признательность заведующему лаборатории биорегуляторов института биоорганической химии АН РУз, кандидату химических наук, старшему научному сотруднику Н.Ж.Сагдиеву за огромную помощь, оказанную при выполнении данной работы.

Биология фанлари номзоди илмий даражасига талабгор Хаджиев Дилмурод Дилъшадовичнинг 03.00.04-Биокимё ихтисослиги бўйича «Aspergillus nigerдан глюкозооксидазани ажратиш, тозалаш ва унинг хусусиятлари» мавзусидаги диссертациясининг

РЕЗЮМЕСИ

Таянч сўзлар: замбуруғлар, глюкозооксидаза, *Aspergillus Niger*, ажратиш усуллари, хроматография, электрофорез, гельфилтрация.

Тадқиқот объекти: Турли штаммдаги замбуруғлар.

Ишнинг мақсади: *Aspergillus Niger*дан глюкозооксидазани ажратиш, тозалаш усулларини ишлаб чиқиш, унинг хусусиятларини ўрганиш ва ушбу усулнинг мавжуд бўлган усуллар билан таққослаш.

Тадқиқот усуллари: культивация, дифференциал центрифуглаш, хроматография, гельфилтрация усуллари, иммунологик текширувлар.

Олинган натижалар ва уларнинг янгилиги: Биринчи мартаба Ўзбекистон Республикасида *Aspergillus Niger* замбуруғи мицелиясида глюкозооксидаза ажратилган ва унинг хусусиятлари ўрганилган. Биологик суюқликларда глюкоза миқдорини аниқлашда ушбу ферментдан фойдаланишнинг қиёсий самарадорлиги ўтказилган.

Амалий аҳамияти: *Aspergillus Niger* замбуруғи мицелиясида юқори тозаланган ҳолатда глюкозооксидаза ферменти ажратилган. Глюкозооксидазага антителалар олинган ва аффин колонка яратилган, у бир босқичда ферментни ажратишга имкон беради. Ажратилган ферментлар асосида биологик суюқликларда глюкозани аниқлаш учун тўплам яратилган.

Татбиқ этиш даражаси ва иқтисодий самарадорлиги: Олинган натижалар ферментларни ажратиш, тозалаш ва хусусиятларини ўрганиш бўйича мавжуд бўлган тушунчаларни кенгайтиради, биологик суюқликларда глюкоза миқдорини аниқлаш учун маҳаллий тўпламлар яратишга имкон беради.

Қўллаш соҳалари: Биокимё, тиббиёт, лаборатор ташхис.

РЕЗЮМЕ

диссертации Хаджиева Д.Д. на тему: «Выделение, очистка и свойства глюкозооксидазы, выделенной из *Aspergillus Niger*» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04-биохимия

Ключевые слова: грибы, глюкозооксидаза, *Aspergillus Niger*, методы выделения, хроматография, электрофорез, гельфильтрация.

Объект исследования: различные штаммы грибов.

Цель исследования: разработать методы выделения, очистки глюкозооксидазы из *Aspergillus Niger*, изучить ее свойства и сравнить информативность данной методики с существующими.

Методы исследования: методы культивирования, дифференциального центрифугирования, хроматографии, гельфильтрации, иммунологические исследования.

Полученные результаты и их новизна: впервые в Узбекистане выделена глюкозооксидаза из мицелия гриба *Aspergillus Niger* и изучены ее свойства. Определена эффективность применения данного фермента при количественном определении глюкозы в биологических жидкостях.

Практическая значимость: получены антитела к глюкозооксидазе и создана аффинная колонка, которая позволяет за один этап выделить данный фермент. На основе выделенных ферментов создан набор для определения глюкозы в биологических жидкостях.

Степень внедрения и экономическая эффективность: полученные результаты расширяют имеющиеся представления о выделении, очистке и свойствах ферментов; помогут создать отечественные наборы для определения глюкозы в биологических жидкостях.

Область применения: биохимия, медицина, лабораторная диагностика.

RESUME

Thesis of Khadgiev Dilmurad on the scientific degree competition of the doctor of philosophy in biology on speciality 03.00.04 – biochemistry subject: “Allocation, clearing and properties glucosooxydasa allocated from Aspergillus Niger”

Key words: mycoses, glucosooxydasa, Aspergillus Niger, methods of allocation, chromatography, electrophoresis, gel filtration.

Subject of enquiry: different types of mycoses.

Aim of enquiry: develop methods of allocation, clearing glucosooxydasa from Aspergillus Niger, investigate of properties and compare of this method with another

Methods of enquiry: methods of cultivation, deferential centrifigure, chromatography, gel filtration, immunologic investigation.

The results achieved and their novelty: For the first time in Uzbekistan was allocated glucosooxydasa from Aspergillus Niger and properties were investigated. Effectively implementation of this ferment in quantity in biologic fluid was determine.

Practical value: antibody for glucosooxydasa were get and created affine column, which let for ones allocate this ferment. On the basis of allocated ferments was build set for determine of glucose in biological fluids.

Degree of embed and economic effectivity: obtained results expand available representations about allocation, clearing and properties ferments; will help to create domestic sets for definition glucose in biological fluids.

Sphere of usage: Biochemistry, medicine, laboratory diagnostics.