

## ОБРОБКА НІТРОЗОГУАНІДИНОМ ДРІЖДЖІВ ЯК СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ АКТИВНОСТІ ФРУКТАНЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ

Янченко К.А., асистент, Пауліна Я.Б., ст.н.с.  
Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса

Для посилення продуктивності фруктанлітичних ферментів деякими культурами дріжджів їх було оброблено розчином нітрозогуанідину, який викликає точкові мутації, але не призводить до високої летальності мікроорганізмів. Внаслідок такої обробки деякі з культур дріжджів послали продуктивність фруктанлітичних ферментів, а у певній культурі така активність з'явилась за відсутності вихідної. Фруктанлітичну активність перевіряли на екстрактах із бульб топінамбура, вміст фруктози визначали полярографічно та за допомогою хроматографії на папері.

To enhance the productivity of fructanlytic enzymes some cultures of yeast were processed by nitrosoguanidine solution, causes the point mutations, but does not cause high mortality of microorganisms. As a result of this treatment are some of the cultures of yeast increased productivity of fructanlytic enzymes, and in certain culture this activity appeared despite the absence of it in the original. Fructanlytic activity was tested on extracts from tubers of Jerusalem artichoke, fructose content was determined by polarography and paper chromatography.

Ключові слова: дріжджі, фруктанлітичні ферменти, мутагенез, фруктани бульб топінамбура, фруктоза.

Фруктоза є цінним поживним складником багатьох продуктів харчування, зокрема і в першу чергу кондитерських, а також дієтичного, дитячого харчування тощо. Одним із джерел фруктози можуть бути запасні цукриди, що містяться у підземних органах деяких рослин родини складноцвітих, а також лілієцвітих. Найважливішим представником таких цукридів є інулін (1) – полімер  $\beta$ -D-фруктози з 35 – 40 (а можливо, й більше) мономерів, що містить початковий залишок  $\alpha$ -D-глюкози. Для того, щоб одержати фруктозу чи принаймні її концентрат із інуліну та його нижчих гомологів, поліцукриди слід гідролізувати. Одним зі способів гідролізу є ферментативний і, зокрема, при допомозі ферментів, які виробляють такі мікроорганізми, як дріжджі. Дріжджі – позатаксономічна група одноклітинних грибів, що втратили міцеліальну будову у зв'язку з переходом до проживання у рідких і напіврідких, багатих на органічні речовини субстратах (2, 3).

Багато видів дріжджів містять цілий спектр гідролаз поліцукридів. Деякі з них містять ферменти, які здатні проявляти фруктозанлітичну активність. До таких ферментів належать як інулінази (ендо-гідролази, КФ 3.2.1.7), так і  $\beta$ -фруктофуранозідази (екзо-гідролази 3.2.1.80, фруктозилтрансферази 3.2.1.93), а також інвертази (КФ 3.2.1.26). Як субстрати для дослідження такої активності використовували водні екстракти з бульб топінамбура, які містять як інулін так і весь спектр інулідів – глюкозилфруктанів, починаючи з кестози –  $\alpha$ -глюкозил- $\beta$ -фруктозил- $\beta$ -фруктози.

У роботі Rikic R. зі співавторами використано іммобілізовані клітини дріжджів *Kluveromyces marxianus*, у яких шляхом мутагенезу підвищено продуктивність інвертази та пектинолітичних ферментів у понад два рази (4). Для підвищення фруктозанлітичної продуктивності дріжджових ферментів було вирішено обробити їх мутагеном – нітрозогуанідином (N-Me-N'-NO<sub>2</sub>-N-NO-гуанідином). Ця речовина належить до мутагенів (5), які викликають точкові мутації шляхом метилування O<sup>6</sup> гуаніну та O<sup>4</sup> тиміну (6). Нітрозогуанідин не викликає високої летальності мікроорганізмів (до 50 %), бо репаративні ферменти впорюються з пошкодженнями молекул нуклеїнових кислот. Мутагенез при допомозі нітрозогуанідину застосовувався і щодо дріжджів, зокрема роду *Phaffia* з метою посилення каротиногенезу (7).

Для проведення дослідів було дібрано 8 штамів дріжджів родів *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluveromyces* і *Saccharomyces*, які було позначено наступним чином, як зазначено у таблиці 1. (Далі нумерація субкультур здійснювалась за першою цифрою вихідних штамів: двозначне число – перша генерація „мутантів”, трізначне число – друга генерація „мутантів”)

Штами культур вирощували на рідкому поживному середовищі, яке містило калій-ортофосфатний буфер, мікродомішку магній сульфату та екстракт із висушених бульб топінамбура з 10 % вмісту сухих речовин, протягом доби. Після цього культури відцентрифугували та ресуспендували у невеликій кількості трис-малеїнового буферу (по 5 мл). Середовища з культурами оброблено розчином зі вмістом 0,1 % нітрозогуанідину (5 : 1) та інкубовано при 30 °C протягом 30 хвилин.

Таблиця 1 – Позначення культур дріжджів, обраних для досліджу

№ з/п	Культура дріжджів	Штам ВКМ
1.	<i>Candida kefir</i>	Y-257
2.	<i>Candida kefir</i>	Y-922
3.	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Y-730
4.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y-389
5.	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Y-1302
6.	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Y-2012
7.	<i>Debaryomyces disporus</i>	Y-1034
8.	<i>Debaryomyces disporus</i>	Y-1575

Після цього культури відцентрифугували та ресуспендували у мінімальній кількості середовища, яке містить ортофосфатний буфер з рН 5,5 і екстракт із топінамбуру зі вмістом сухих речовин 10 % масових. Потім знову відцентрифугували та ресуспендували у такому ж середовищі та проводили вирощування протягом доби. Далі висівали культури на тверде поживне середовище на основі агаріду, що містило екстракт із висушених бульб топінамбура.

Субкультури дріжджів (по 10 субкультур з кожного штаму) посіяли на те ж саме середовище. Далі висіяні “мутанти” інокульовано у рідке поживне середовище, що містить 5 % цукрів зі змішаного екстракту сухих і свіжих бульб топінамбура (по 2 мл) та інкубовано протягом близько доби при 30 °С. Після чого додавали ще по 3 мл змішаного екстракту з бульб топінамбура та струпували на качалці у термостаті при 52 °С (для інактивації інших дріжджових ферментів).

Вміст фруктози визначали полярографічно у триелектродній комірці з каломельним і крапельним ртутним електродами з параметрами: напруга  $U = -1,25$  В; швидкість зміни потенціалу  $v(\varphi) = 10$  мВ/с; зміна струму  $\Delta I = 10$  мкА; швидкість стрічки самописця  $v_{cmp} = 720$  мм/год. Також проводили хроматографічний (на папері) аналіз складу цукрів у деяких зразках середовища обробленого ферментами дріжджів. Як рідкий носій використовували системи, що містили н-бутанол, оцтову кислоту, етилацетат і воду. Після висушування хроматограми проявляли. Склад проявної суміші: 2 см<sup>3</sup> феноламіну (аніліну), 2 г дифеніламіну, 15 см<sup>3</sup> ортофосфатної кислоти ( $\omega = 85\%$ ), 100 см<sup>3</sup> пропанону (ацетону). Після проявлення з паперових хроматограм вирізали відповідні плями вимивали льодяною оцтовою кислотою та фотометрували при експериментально визначених максимумах  $\lambda = 515$  нм (і додатково при  $\lambda = 635$  нм). Зі зразкової хроматограми цукрів можна судити, що у першу чергу в процесі гідролізу фруктанів беруть участь екзоферменти та, можливо, інвертаза.

З 80 субкультур і 8 вихідних більшість не виявляла помітного та сталого нагромадження фруктози у ферментованому середовищі, і тому було обрано 16 субкультур (належних до 5 вихідних штамів), які помітно проявляли фруктозанлітичну активність для подальших дослідів. Після повторних перевірок такої активності зі 16 субкультур вибрано 4 найбільш продуктивних: *Candida kefir* зі штамів ВКМ Y-257 і Y-922 (№№ 18, 20), *Kluyveromyces marxianus* зі штаму ВКМ Y-2012 (№ 60), *Debaryomyces disporus* зі штаму ВКМ Y-1034 (№ 70). (Варто зазначити, що вихідний штам *Debaryomyces disporus* (№ 7) майже не виявляв фруктанлітичну активність.)

Обрані 4 субкультури було повторно оброблено двократною концентрацією мутагену так само, як було зазначено раніше. По 10 одержаних субкультур разом із вихідними субкультурами досліджували на фруктозанлітичну активність. З них було вибрано 8 найбільш активних: 3 (№№ 20, 60, 70) після першої та 5 (№№ 186, 604, 605, 703, 708) після другої обробки, із якими тривали подальші дослідження.

Таблиця 2 – Вміст фруктози у ферментованих середовищах, визначений полярографічним і хроматографічним методами

№ культури	Полярографія		Хроматографія	
	$h(\text{пол.хв.}), \text{мм}$	$\omega(\text{фр.}), \%$	$D_{515}$	$\omega(\text{фр.}), \%$
186	142	6,23	0,104	5,33
20	104	4,56	0,091	4,67
60	160	7,02	0,118	6,05
604	170	7,46	0,138	7,08
605	142	6,23	0,123	6,31
70	69	3,03	0,083	4,26
703	89	3,97	0,087	4,46
708	85	3,73	—	—

Таким чином, можна визначити, що обробка мутагеном (нітрозогуанідином) культур деяких дріжджів призводить до підвищення продуктивності фруктозанлітичних ферментів (від 10 до 80 % у *Candida kefyr*, культури №№ 1, 2 до 2-3 разів у *Kluyveromyces marxianus* зі штаму, № 6), а інколи навіть появи активних фруктанлітичних ферментів за відсутності таких у вихідній культурі (*Debaryomyces dispersus*, № 7).

### Література

1. Спектроскопические исследования строения инулина, выделенного различными способами из топинамбура при помощи изотопного Н/Д обмена. (Гулый И.С., Бобровник Л.Д., Лезенко Г.А.) / Топинамбур и топинамбур – проблемы возделывания и использования: Тезисы доповідей III всесоюзної конф., Одеса, 7 – 11 жовтня 1991 року, с. 77.
2. Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (2006). «[Yeast Systematics and Phylogeny – Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology](#)». *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, The Yeast Handbook*, pringer. [http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?SEQ\\_NO\\_115=176765](http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?SEQ_NO_115=176765). Процитовано 7 січня 2007.
3. Bass D.; Howe, A.; Brown, N.; Barton, H.; Demidova, M.; Michelle, H.; Li, L.; Sanders, H.; Watkinson, S.C.; Willcock, S.; Richards, T.A.. Yeast forms dominate fungal diversity in the deep oceans// *Proc Biol Sci.* – (2007-10-16).
4. Rikir R. & oth. *A multipotential hydrolytic reactor using the yeast strain Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry & Biotechnology*. 1990, 24 – 25, p. 511 – 519.
5. *Методы общей бактериологии*. М. „Мир”, 1984, с.15
6. Вікіпедія. *Нітрозогуанідин*. 2011.
7. Автореф. дис. канд. с.-г. наук. Каротиногенез у різних штамів дріжджів *Phaffia rhodozyma* та їх застосування у живленні курей-несучок: 03.00.04 / М. В. Камінська; Ін-т біології тварин УААН. – Льв., 2006. – 18 с.: рис. – укр.

УДК 665.3.093.4

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ФОСФОЛИПАЗЫ С

Волошенко С.В., младший научный сотрудник

Украинский научно-исследовательский институт масел и жиров Национальной академии  
аграрных наук Украины, г. Харьков

Гладкий Ф.Ф., д-р техн. наук, профессор

Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», г. Харьков

*В статье сформулирована задача исследования функциональных свойств ферментного препарата отечественного производства, в состав которого входит фосфолипаза С, для проведения реакции ферментной гидратации растительных масел с целью создания экологически чистой технологии.*

*In the article for the purpose of creation the new ecologically pure technology the problem of research the functional properties of the enzyme preparation of domestic production, which consist phospholipase C, for reaction of enzyme degumming vegetable oils are formulated.*

Ключевые слова: ферментная гидратация, фосфолипаза С, экологически чистая технология.

На сегодняшний день в мире ферментные технологии применяют в хлебопечении, в кондитерской промышленности, в мясомолочной промышленности, в приготовлении напитков, в производстве масел и жиров, а именно в производстве специальных жиров, косметических препаратов, гидратации масел и переэтерификации жиров [1].

Одними из основных ферментов, которые катализируют биохимические реакции в превращениях фосфолипидов, являются фосфолипазы.

В процессе рафинации растительных масел на этапе их гидратации с успехом внедрены в промышленность технологии, которые предусматривают использование ферментных препаратов, содержащих фосфолипазы А1 и А2.

Согласно литературным данным, а также на основании исследований, проведенных в Украинском научно-исследовательском институте масел и жиров Национальной академии аграрных наук Украины,