

УДК 582.281.212:579.66:57.083.132

И.М. ЗУБАРЕВА, Н.Б. МИТИНА, Е.С. КИРИЧЕНКО

## ИЗУЧЕНИЕ ЛИПАЗНОЙ АКТИВНОСТИ *BLAKESLEA TRISPORA* – ПРОДУЦЕНТА БЕТА-КАРОТИНА

ГВУЗ „Украинский государственный химико-технологический университет”, г. Днепропетровск

Изучено влияние факторов внешней среды на активность триглицеридгидролазы *Blakeslea trispora*, а именно: присутствия в реакционной среде ионов некоторых металлов и некоторых анионов, а также свойств, применяемых буферных растворов.

В качестве промышленного продуцента бета-каротина разработан мукоровый гетероталлический гриб *Blakeslea trispora*, который представлен (+) и (–) совместимыми штаммами. Бета-каротин синтезируется в клетках гриба только при совместном выращивании обеих форм. В промышленных условиях совместное культивирование проводится на стадии ферментации в периодическом режиме на жидких питательных средах, содержащих кроме основного и вспомогательных субстратов, 4% растительного масла. Жировой компонент в составе питательной среды выполняет несколько функций, одна из которых многократное увеличение выхода бета-каротина [1]. Известно, что присутствие в питательных средах как растительных, так и животных жиров вызывает у микроорганизмов, в том числе и у мицелиальных, выработку ферментов липаз [2]. По международной классификации данный фермент относится к классу гидролаз, т. е. функционирует по схеме  $XU + H_2O \rightarrow XH + YOH$ ; имеет кодовый номер КФ 3.1.1.3 – триглицеридгидролаза, по локализации относительно клеточной мембраны, является внеклеточным [2]. В процессе гидролиза жиров с участием фермента липазы образуются жирные кислоты, которые усваиваются грибом-продуцентом и стимулируют в клетках синтез каротиноидов, среди которых у *Blakeslea trispora* преобладает бета-каротин. Каротиноиды по своей химической природе относятся к классу липидов. Следовательно, процессы усвоения липидов и каротиногенез у *Blakeslea trispora* взаимосвязаны и требуют более тщательного изучения.

Ферменты липазы находят все более широкое применение при производстве моющих средств, сыров, для аналитических и технических целей, в медицине [3,4]. Учеными ведется поиск активных продуцентов липаз среди различных микроорга-

низмов, в том числе и среди микроскопических грибов. С учетом выше изложенного продуцент бета-каротина *Blakeslea trispora* одновременно может рассматриваться и как продуцент внеклеточного индуцибельного (адаптивного) фермента липазы.

В представленной работе изучено влияние факторов внешней среды на активность триглицеридгидролазы (липазы) *Blakeslea trispora*, а именно: присутствия в реакционной среде ионов некоторых металлов и некоторых анионов, а также свойств, применяемых буферных растворов.

Смешанную культуру *Blakeslea trispora* выращивали на жидкой питательной среде в периодическом режиме в промышленном посевном аппарате. Режим перемешивания 229 об./мин, температурный режим 24–26°C, состав питательной среды: мука кукурузная – 2,3%; мука соевая – 4,7%;  $KH_2PO_4$  – 0,05%; тиамин-солянокислый – 0,0002%; масло подсолнечное – 4%. Длительность выращивания 40–48 ч.

По окончании ферментации культуральную жидкость разделяли на фракции, для этого проводили центрифугирование культуральной жидкости при скорости вращения ротора 5000 об./мин в течение десяти минут. Липолитическую активность определяли в жидкой фракции (нативном растворе) культуральной жидкости методом Ота и Ямада [1] по разнице титрования опытных и контрольных проб и выражали в условных единицах (мл 0,01 н. раствора КОН, пошедшего на титрование образовавшихся в ходе гидролиза жирных кислот).

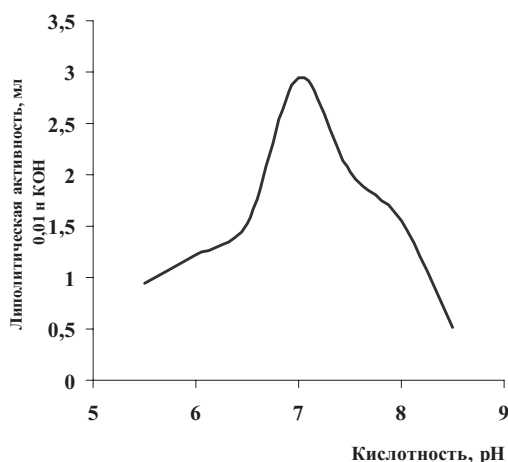
Состав опытных и контрольных проб: по 2 мл нативного раствора культуральной жидкости, 2 мл 0,1 М фосфатного буфера и 5 мл эмульсии. Эмульсия представляет собой смесь 30% подсолнечного масла в 2% растворе поливинилового

спирта. Готовили эмульсию на установке смешивания типа «Воронеж» в течение пяти минут при скорости перемешивания 9000 об./мин. Реакционную смесь тщательно перемешивали. Опытные пробы культивировали в термостате при 30°C в течение 2,5 ч. Прерывали реакцию путем внесения в реакционную смесь 15 мл ацетона. Свободные жирные кислоты, которые выделяются в ходе гидролиза (липолиза), оттитровывали 0,01 н. водным раствором КОН до рН10. Контрольные пробы оттитровывали без выдерживания в термостате.

Для выявления зависимости активности фермента липазы от качества и количества ионов в реакционную смесь вносили по 1 мл водных растворов соответствующих солей в интервале концентраций  $4 \cdot 10^{-4}$ – $4 \cdot 10^{-2}$ М. Опыты выполняли в пяти повторениях. Полученные результаты обрабатывали методами математической статистики [5].

Для изучения липазной активности ферментов микробного происхождения в соответствии с методиками [1] применяют различные буферные растворы. Так, для проведения реакции липолиза чаще используют фосфатный буфер или трис-буфер. Но активность ферментов липаз может значительно изменяться в зависимости от свойств использованного буфера. Поэтому в работе изучено влияние таких свойств указанных буферов, как кислотность и молярность на активность фермента липазы *Blakeslea trispora*. Концентрации буферных растворов: 0,05 М; 0,07 М; 0,1 М.

В присутствии трис-буфера грибная липаза обнаружила наибольшую активность при значении кислотности 7,0 и достигла 3,0 условных единицы. Как при увеличении значения рН (в щелочную сторону), так и при его снижении (в кислотную сторону) липазная активность продуцента явно уменьшалась. Использование 0,05 М и 0,07 М трис-буфера оказало еще более неблагоприятное действие на активность фермента липазы (рисунок).



Влияние кислотности и концентрации (0,1 М) трис-буфера на липолитическую активность *Blakeslea trispora*

Липазная активность гриба видимо возросла в случае применения фосфатного буферного раствора (табл. 1). Максимальную активность липаза проявляла в присутствии 0,1 М фосфатного буфера при рН 7,5. Величина липазной активности составляет практически 12 условных единиц.

Таблица 1

Влияние кислотности и концентрации фосфатного буфера на липолитическую активность (ЛА) *Blakeslea trispora*

Кислотность, рН	ЛА мл 0,01 н. КОН, концентрация фосфатного буфера 0,05 М	ЛА мл 0,01 н. КОН, концентрация фосфатного буфера 0,07 М	ЛА мл 0,01 н. КОН, концентрация фосфатного буфера 0,1 М
5,6	3,79	4,93	5,57
6,0	4,51	5,25	6,35
6,5	5,98	6,56	9,85
7,0	6,89	8,53	10,20
7,5	8,51	9,75	11,97
8,0	6,75	8,15	10,85
8,5	5,01	6,30	8,63

Фосфатный буфер меньшей емкости, а именно 0,05 М и 0,07 М обеспечивает некоторое снижение активности фермента. Но, следует отметить, что при любой проверенной концентрации буфера наибольшая активность липазы проявляется при рН 7,5.

Следовательно, для дальнейших работ по изучению липазной активности продуцента рекомендовано использовать 0,1 М фосфатный буфер. Прочие условия, обеспечивающие максимальную активность липазы следующие: температура – 30°C, рН реакционной среды 7,5, длительность реакции 2,0–2,5 ч [6].

Известно, что активность ферментов, в том числе и липаз мицелиального происхождения, регулируется ионами различных металлов [1,7]. Причем одни и те же ионы способны у одних видов микроорганизмов ингибировать липолитические ферменты, а у других – активировать. Кроме того, биохимический анализ биомассы и шрота *Blakeslea trispora* выявил присутствие в них ряда микро- и макроэлементов. В несколько большей концентрации – Cu, Mg, Fe, Mn, Zn; в меньшей концентрации – P, Co [8].

В работе изучено действие ряда металлов на липазную активность *Blakeslea trispora*. В эксперименте использовали соли соответствующих металлов в диапазоне концентраций  $4 \cdot 10^{-2}$ – $4 \cdot 10^{-4}$ М. Выбранные границы концентраций объясняются растворимостью этих веществ в воде. Поскольку использовали только хлориды исследуемых металлов, то влиянием анионов, в условиях данного эксперимента, возможно пренебречь. В качестве контроля служили пробы без добавления

ионов металлов. Липолитическая активность в контроле соответствует 100% (табл. 2).

Таблица 2

**Действие ионов металлов на липазную активность *Blakeslea trispora***

Ионы металлов	Липолитическая активность, % к контролю для хлоридов концентрации, М		
	$4 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-4}$
Na	89,50	100,05	101,83
K	90,10	89,43	92,70
Ca	89,50	70,56	81,06
Mg	60,76	78,03	84,15
Mn	104,51	64,47	58,68
Zn	58,35	54,05	70,51
Fe	99,91	104,63	105,41

Полученные результаты свидетельствуют, что в условиях эксперимента ионы изученных металлов не оказали значительного активирующего действия ни липазу продуцента. С увеличением концентрации  $Mn^{+2}$  ( $4 \cdot 10^{-2}M$ ) липолитическая активность несколько увеличилась на 4,5%. Незначительно повысилась липазная активность и в присутствии ионов железа в концентрации  $4 \cdot 10^{-3}$ – $4 \cdot 10^{-4}$ , в среднем на 5%. Ионы Na, K, Ca не изменили активность внеклеточной липазы ни в одной из исследованных концентраций. Под влиянием  $Mg^{+2}$  и  $Zn^{+2}$  наблюдалось обратное действие, активность фермента подавлялась: в присутствии иона  $Mg^{+2}$  на 25%, в среднем, по всем рассмотренным концентрациям; в присутствии иона  $Zn^{+2}$  – аналогично на 37% от контроля.

Таким образом, наиболее нежелательное влияние оказывает на активность липазы *Blakeslea trispora* присутствие цинка. Значительного повышения липазной активности изученные вещества не проявили.

Вероятно, более существенное влияние на активность липазы продуцента оказывают различные анионы. Поскольку ион  $Na^+$  и  $K^+$  не изменяли липазную активность, то для выявления зависимости липолитической активности гриба от природы аниона в эксперименте использовали различные соли натрия и калия в концентрации  $1 \cdot 10^{-2}M$ . Получение результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

**Зависимость липолитической активности гриба *Blakeslea trispora* от природы аниона**

Соли натрия	ЛА, % к контролю	Соли калия	ЛА, % к контролю
Сульфат	120,03	Сульфат	117,93
Карбонат	67,49	Карбонат	65,90
Хлорид	98,25	Хлорид	97,07
Нитрат	87,37	Нитрат	84,99
Фосфат (орто)	107,57	Фосфат (орто)	105,13
Ацетат	86,01	Ацетат	84,38
Оксалат	160,59	Оксалат	159,74

Установлено, что нитратный и ацетатный анионы незначительно снижают активность липазы, а именно на 15% от контроля.

Анион соляной кислоты практически не оказывает влияние на липазную активность гриба.

Значительное снижение активности фермента, именно на 35%, вызывает карбонатный анион. Сульфатный и оксалатный анионы положительно влияют на липолитическую активность продуцента.  $SO_4^{-2}$  повышает активность на 18%, а в присутствии оксалатного аниона активность увеличивается на 60%, активность фермента в присутствии аниона ортофосфатной кислоты увеличивается на 5%.

Таким образом, выявлены оптимальные условия функционирования внеклеточного фермента липазы *Blakeslea trispora*. Максимальную активность фермент проявляет в присутствии фосфатного буфера при концентрации 0,1 М. Оптимальная кислотность реакционной среды составляет 7,50. Присутствие ионов  $Mg^{+2}$  и  $Zn^{+2}$ , а также ацетатного, нитратного и особенно карбонатного анионов снижает липазную активность гриба. Липазная активность продуцента усиливается под влиянием иона  $Mn^{+2}$ , аниона  $PO_4^{-3}$ , а также сульфатного и особенно оксалатного анионов. Выявленные закономерности необходимо учитывать при выращивании смешанной культуры гриба *Blakeslea trispora* не только как продуцента бета-каротина, но и потенциального промышленного продуцента внеклеточного фермента липазы.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Липолитическая активность гриба *Blakeslea trispora* / Васильченко С.А., Баталкина Л.В., Василенко Е.В., Берников Н.И., Светкин Ю.В. // Вопр. химии и хим. технологии. – 1989. – Вып.91. – С.49-52.
2. Сергеева Я.Э., Галанова Л.А., Феофилова Е.П. О новой функции трегалозы и об особенностях липидообразования у мицелиальных грибов // Микробиология. – 2010. – Т.79. – № 4. – С.470-474.
3. Биотехнология. Производство белковых веществ / Быков В.А., Монаков М.Н., Пивнилов В.И., Свитцов А.А., Тарасова Н.В. / Ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. – Кн. 5. – М.: Высш. школа, 1987. – 143 с.
4. Давранов К.Д. Фундаментальные и природные аспекты исследования липаз микроорганизмов // Достижение биотехнологии – агропромышленному комплексу: тез. докл. Всесоюзной конф. – Черновцы, 1999. – С.95.
5. Математичне моделювання та оптимізація об'єктів технології неорганічних речовин / Л.А. Фролова, Б.І. Мельников, Ю.Д. Галівець, Н.Б. Мітіна. – Дніпропетровськ: Жур. фонд, 2010. – 208 с.
6. Экзолипазная активность гриба *Blakeslea trispora* / С.А. Васильченко, Л.В. Баталкина, Е.В. Василенко, Ю.В. Светкин // Ферментативная и спиртовая промышленность. – 1987. – № 1. – С.32-34.

7. Лобырева Л.Б. Влияние ионов металлов на липолитическую активность дрожжей рода *Candida* // Изв. АН СССР. Сер. биол. — 1973. — № 4. — С.581-584.

8. Биохимический состав биомассы гриба *Blakeslea trispora* ТНАХТ / О.В. Калинин, А.Н. Калинин, В.Д. Чиванов, В.И. Киндя // Природничий альманах. — 2009. — № 13. — С.39-49.

Поступила в редакцию 1.12.2011