

УДК 582.281.212:579.66:57.083.132

И. М. ЗУБАРЕВА, Н. Б. МИТИНА

ИЗУЧЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ ЛИПАЗ ГРИБА *BLAKESLEA TRISPORA*

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

Определена субстратная специфичность ферментов липаз гриба *Blakeslea trispora* к некоторым растительным маслам, а также оптимальные условия функционирования данного фермента.

Промышленным продуцентом каротиноидов, в том числе и β -каротина, является гриб *Blakeslea trispora*, который относится к классу *Zygomycetes*. Гриб представлен двумя совместимыми (+), (–) половыми формами, которые культивируются совместно на жидких питательных средах в периодическом режиме. Для обеспечения оптимальных условий развития гетероталлической культуры продуцента, в посевные и ферментационные питательные среды, в соответствии с регламентом, вносят 4% и 2% растительного масла соответственно. Известно, что липиды важны для нормального метаболизма гриба, и внесение масла в среду в несколько раз увеличивает содержание β -каротина в клетках гриба [1].

Присутствие субстратного масла в составе питательной среды индуцирует синтез у мицелиальных микроорганизмов липолитических ферментов – триглицеридгидролаз [2]. Ферменты липазы обеспечивают утилизацию субстратного масла грибом путем расщепления триглицеридов до свободных жирных кислот, которые включаются в клеточный метаболизм.

Таким образом, процессы метаболизма липидов и синтез каротиноидов у *Blakeslea trispora* взаимосвязаны и требуют более глубокого изучения.

Целью данной работы является изучение влияния ряда факторов внешней среды на активность внеклеточного фермента липазы гриба *Blakeslea trispora*, в том числе и природы используемого растительного масла.

Объектом исследования является гетероталлическая культура мукорового гриба *Blakeslea trispora*. (+), (–) штаммы выращивали в посевных аппаратах при температуре 24–26°C. Длительность культивирования 30 ч. Использовали питательную среду, содержащую: кукурузную муку – 2,3%, соевую муку – 4,7%, масло подсолнеч-

ное – 2–4%, витамин В₁ – 0,0002%, калий солянокислый однозамещенный – 0,05%. По окончании процесса выращивания продуцента из культуральной жидкости (КЖ) выделяли биомассу методом центрифугирования при скорости вращения ротора 5000 об./мин в течение 10 мин.

Липазную активность (ЛА) определили в жидкой фракции культуральной жидкости, поскольку ферменты липазы имеют внеклеточную локализацию. Для этого использовали метод Ота и Ямада [3], в соответствии с которым ЛА просчитывается по разнице результатов титрования опытных и контрольных проб и выражали в условных единицах (мл 0,01 н. раствора КОН, пошедшего на титрование образовавшихся жирных кислот).

В опытную и контрольную пробы вносим по 2 мл КЖ, 2 мл 0,1 М фосфатного буфера и 5 мл 30% эмульсии подсолнечного масла в 2% растворе поливинилового спирта. Эмульсию предварительно готовили на смесительной установке «Воронеж» при 9000 об./мин в течение 5 мин.

Реакционную смесь тщательно перемешивали, опытные пробы выдерживали в термостате в течение 2 ч при 30°C. Реакцию прерывали внесением 15 мл ацетона, выделившиеся в результате гидролиза (липолиза) свободные жирные кислоты оттитровывали 0,01 н. водным раствором КОН до значения рН 10. Контрольные пробы оттитровывали без выдерживания в термостате.

Все опыты выполняли в пяти повторностях, результаты обрабатывали методом математической статистики [4].

В промышленные питательные среды, в соответствии с регламентом, вносится подсолнечное масло. Но необходимо проверить влияние и других растительных масел на активность ферментов липаз у *Blakeslea trispora*.

Кроме подсолнечного, использовали льняное, кукурузное, оливковое и хлопковое масла.

Установлено, что наибольшую субстратную специфичность грибные липазы проявили к льняному маслу, наименьшую — к хлопковому (таблица).

Зависимость липолитической активности (ЛА) *Blakeslea trispora* от природы субстратного масла

Вид растительного масла	ЛА, мл 0,01 н. КОН
льняное	9,1
кукурузное	8,6
оливковое	8,3
подсолнечное	7,6
хлопковое	6

Подобное изменение активности липаз в ряду исследованных растительных масел, видимо, не случайно, и объясняется содержанием в маслах ненасыщенных жирных кислот [5].

В данной работе проверено также влияние ряда факторов на активность внеклеточного фермента гриба *Blakeslea trispora*: температуры, pH среды, длительности реакции. Для поставленных целей использовали 0,1 М фосфатный буфер

Изменение липолитической активности рассмотрено в температурном промежутке от 15⁰С до 50⁰С при длительности выдержки в 1 ч. Выявлено, что при повышении температуры от 15⁰С до 30⁰С активность фермента возрастает в 2,5 раза, при дальнейшем увеличении температуры, активность резко снижается (рис. 1), что можно объяснить инактивацией фермента липазы.

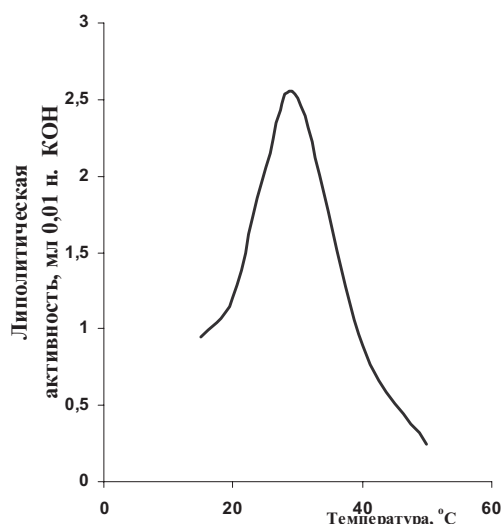


Рис. 1. Влияние температуры на липолитическую активность гриба *Blakeslea trispora*

Влияние кислотности проверено при оптимальной температуре 30⁰С и длительности инкубации 1 ч. В таких условиях оптимальное значение pH для фермента липазы соответствует значению 7,55 (рис. 2).

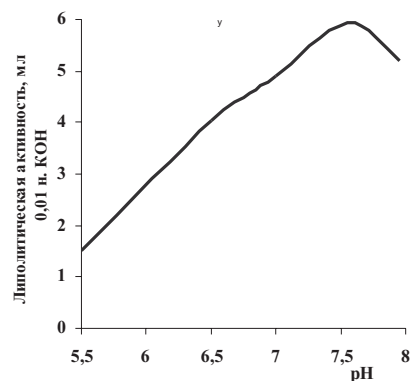


Рис. 2. Зависимость липолитической активности гриба *Blakeslea trispora* от pH буфера

Длительность инкубации также влияет на липолитическую активность продуцента. В течение первых 2-х ч активность увеличивается, с 2-х до 3-х ч скорость реакции практически не меняется, после 3-х ч — снижается (рис. 3).

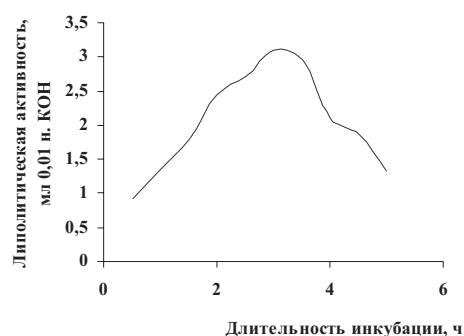


Рис. 3. Зависимость липолитической активности гриба *Blakeslea trispora* от длительности инкубации

Это означает, что до двух часов инкубации реакционной смеси фермент липаза функционирует активно, и количество образующихся жирных кислот возрастает, а после трех часов выдержки накапливается такое количество продуктов реакции (свободных жирных кислот), которое инактивируют исследуемый фермент липазу.

Для подтверждения правильности сформулированных предположений были проведены дополнительные опыты с внесением олеиновой кислоты и хлористого кальция в реакционную смесь. Получено, что в присутствии 30 мкМ кислоты активность фермента снижалась в 20 раз. В реакционную смесь, содержащую олеиновую кислоту, вносили 35 мкМ хлористого кальция, который, взаимодействуя с кислотой, преобразовывал ее в нерастворимую соль. В результате кислота уже не могла инактивировать липазу, и активность фермента увеличивалась в 1,75 раза.

Следовательно, в условиях данного эксперимента обнаружено, что внеклеточный фермент липаза гриба *Blakeslea trispora* наиболее активен при

температуре 30⁰С, рН среды – 7,55 и длительность реакции не более 3 ч.

Таким образом, в данной работе определена субстратная специфичность внеклеточных липаз к некоторым растительным маслам. Наибольшая специфичность обнаруживается у льняного масла, но из экономических соображений рекомендовано использование в промышленных условиях добавления кукурузного масла, вместо подсолнечного, которое применяется в соответствии с действующим регламентом. Определены также оптимальные условия функционирования ферментов липаз мукорового гриба *Blakeslea trispora* по температуре, кислотности среды и длительности реакции.

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. *Биотехнология.* Производство белковых веществ / Быков В.А., Монаков М.Н., Пивфилов В.И., Свитцов А.А., Тарасова Н.В. / Ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. – Кн. 5. – М.: Высш. школа, 1987. – 143 с.
3. Экзолипазная активность гриба *Blakeslea trispora* / С.А. Васильченко, Л.В. Баталина, Е.В. Василенко, Ю.В. Светкин // *Ферментативная и спиртовая промышленность.* – 1987. – № 1. – С.32-34.
4. *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.
5. Шиков А.Е., Макаров В.Г., Рыженков В.Е. *Растительные масла и масляные экстракты.* Технология, стандартизация, свойство – М.: Русский врач, 2004. – 174 с.

Поступила в редакцию 05.01.2012