

А.В. БОРИСЕНКО, асп.,

І.В. ЛИЧ, канд. біол. наук,

М.М. АНТОНЮК, канд. техн. наук

Національний університет харчових технологій, м. Київ

В.Л. АЙЗЕНБЕРГ, канд. біол. наук

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, м. Київ

ВИЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНИХ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ RHIZOPUS SP 2000 ФМ — ПРОДУЦЕНТА ПОЗАКЛІТИННОЇ ЛІПАЗИ

Досліджено фізіолого-біохімічні особливості нового активного продуцента екзоліпази — термотолерантного штаму *Rhizopus sp 2000 ФМ* та вивчено вплив деяких технологічних параметрів його культивування на синтез ферменту. Обрано оптимальні джерела вуглецю (соняшникова олія) та азоту (соеве борошно) для максимального синтезу ліпази.

Ключові слова: екзоліпаза, ліполітична активність, *Rhizopus sp 2000 ФМ*, оптимізація, умови культивування.

Исследованы физиолого-биохимические особенности нового активного продуцента экзOLIпазы — термотолерантного штамма *Rhizopus sp 2000 ФМ*, изучено влияние некоторых технологических параметров его культивирования на синтез фермента. Подобраны оптимальные источники углерода (подсолнечное масло) и азота (соевая мука) для максимального синтеза липазы.

Ключевые слова: экзOLIпаза, липолитическая активность, *Rhizopus sp. 2000 ФМ*, оптимизация, условия культивирования.

Investigated physiological and biochemical properties of new active producer of extracellular lipase — thermotolerance strain *Rhizopus sp FM 2000* and the influence of some technological parameters of its cultivation on the synthesis of the enzyme. Elected optimal carbon source (sunflower oil — 1 %) and nitrogen (soybean meal — 2 %) for maximum production of lipase.

Keywords: out-cell lipase, lipolytic activity, *Rhizopus sp 2000 ФМ*, optimization, conditions for cultivating.

Серед ряду біологічно активних речовин ферменти посідають одне із провідних місць у практичному застосуванні в різних галузях промисловості, народного господарства та медицини. Використання ферментів у народному господарстві вигідне як з економічної, так і з екологічної точок зору. Основну частину ферментів світового ринку складають гідролази [5]. Ліпази як гідролітичні ферменти широко використовуються для очищення стічних вод від жирів, при переробленні побутових відходів, у сільському господарстві, харчовій промисловості. Не менш перспективним є впровадження термостабільних ліпаз у вітчизняне виробництво мючних засобів [2].

Біотехнологічний спосіб одержання ферментних препаратів залишається найдоцільнішим за економічністю та ефективністю. Тому пошук нових продуцентів ензимів серед мікроорганізмів, зокрема мікроскопічних грибів, які залишаються ефективними продуцентами позаклітинної ліпази для промислових виробництв, є актуальним напрямом досліджень [4].

Визначальними факторами максимального виходу необхідного ферменту є не лише відбір високоактивного продуцента, а й створення оптимальних умов його культивування, з урахуванням складу поживного середовища, віку посівної культури, температури вирощування, рН середовища, режиму аерації. Поживне середовище має включати компоненти, які забезпечують спрямований біосинтез ферменту, тобто сполуки, які містять азот, вуглець, кисень та мінеральні речовини [3].

Метою наших досліджень було встановлення впливу основних компонентів поживного середовища на рівень біосинтезу позаклітинної ліпази *Rhizopus* sp 2000 ФМ, розроблення оптимізованого поживного середовища за ознакою цільової (ліполітичної) активності продукту та оптимізація умов культивування *Rhizopus* sp 2000 ФМ — перспективного продуцента екзоліпази.

Матеріали та методи досліджень

Дослідження проводили з використанням мікроміцету *Rhizopus* sp 2000 ФМ з колекції штамів мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології НАН України. Культуру вирощували глибинно на поживному середовищі у колбах Ерленмеєра (об'єм 0,75 см³) за різних температурних режимів (26—28 °С; 38—40 °С та 42 °С) при безперервному перемішуванні (160 та 220 об/хв). Як посівний матеріал для ферментаційного середовища використовували 0,5 мл водної суспензії конідій штаму *Rhizopus* sp 2000 ФМ, вирощеного на сусло-агарі упродовж двох тижнів. Вирощування мікроміцетів для інокулюму та основного ферментаційного середовища проводили на підібраних середовищах глибинним способом.

Накопичення біомаси визначали ваговим методом за сухою масою міцелію. Культуральну рідину відокремлювали центрифугуванням, з подальшим висушуванням до постійної маси міцелію у сушильній шафі за температури 100±2 °С.

Визначення рН культуральної рідини проводили потенціометрично. Ліполітичну активність (ЛА) визначали спектрофотометричним методом, суть якого полягає у дії ліпази на хромогенний субстрат — фенольний ефір пальмітинової кислоти з вивільненням у результаті реакції п-нітрофенолу (пНФ), що викликає зміну оптичної густини реакційної суміші. Емульгатором слугував дезоксихолат натрію, захисним колоїдом — гумміарабік.

Значення ліполітичної активності розраховували за формулою (2). За одиницю активності приймають таку кількість ферменту, що каталізує вивільнення 1 моль п-нітрофенола з емульгованого субстрату за 1 хв при 37 °С [1]:

$$LA = \frac{\Delta E \times V_s}{\varepsilon \times d \times V_n}, \quad (1)$$

де ЛА — ліполітична активність, нмоль/хв мл; ΔE — зміна величини екстинції за 1 хв; V_s — загальний об'єм реакційної суміші, мл; ε — коефіцієнт екстинції п-нітрофенолу при зазначених умовах; $\varepsilon = 0,015$ нмоль; $d = 0,5$ см; V_n — об'єм проби ферменту для реакції, мл; $V_n = 10,1$ мл;

$$LA = 222,2 \cdot \Delta E, \quad (2)$$

Всі експерименти проводили у трьох повторностях. У таблицях наведено середні арифметичні величини. Відхилення від середнього значення не перевищувало 5 %.

Результати досліджень та їх обговорення.

Оптимальний склад середовища для культивування продуценту визначали методом емпіричного підбору, оскільки середовище містить соєве борошно — компонент змінного складу. При підборі складу оптимального поживного середовища вивчали фізіологічні та біосинтетичні особливості продуценту за основними факторами — джерелами вуглецевого та азотного живлення.

Із літературних джерел відомо, що вибірковість відносно джерел вуглецю та азоту в поживному середовищі є видовою особливістю мікроорганізмів, а підбір середовища культивування визначає вихід цільового продукту.

Ліпаза має індукцибельну природу, тому до складу поживного середовища обов'язково включають речовину, що може бути індуктором біосинтезу певного ферменту, у даному випадку — жир, що міститься у рослинних оліях.

ТЕХНОЛОГІЯ

Для культивування *Rhizopus* sp 2000 ФМ використовували рідкі поживні середовища з мінеральною основою середовища Чапека та різними джерелами вуглецю у концентраціях 0,5; 1,0 та 2,0 %. Вплив компонентів вуглецевого живлення на ліпазну активність та ріст досліджуваної культури визначали експериментально при використанні таких джерел вуглецю: рослинних олій (соняшникової, оливкової, лимонної, реп'яхової, рапсової, рицинової, горіхової та кукурудзяної), вуглеводів (глюкози, арабінози, мальтози, ксилози, сахарози, лактози та крохмалю), багатоатомних спиртів та поверхнево-активних речовин (інозиту, сорбіту, дульцину, твіну-20).

Результати, отримані при культивуванні гриба *Rhizopus* sp 2000 ФМ на середовищах із різними оліями, як джерелами вуглецю (концентрація 0,5—2,0 %) показали, що найвищий рівень ЛА в гриба досягнуто на середовищі із соняшниковою олією 1% — 58,33 од./мл. Наявність у складі поживного середовища соєвої, рицинової, горіхової олій у концентрації 1% індукує синтез екзоліпази грибом *Rhizopus* sp 2000 ФМ у межах від 16,66 од./мл до 9,1 од./мл. Достатньо висока ЛА даного штаму відмічена на середовищах з використанням 1% сахарози — 33,3 од./мл і крохмалю 2% — 34,1 од./мл. У результаті культивування *Rhizopus* sp 2000 ФМ на середовищах з багатоатомними спиртами і твіном-20, як джерелами вуглецю, було зафіксовано слабкий ріст культури і відсутність ЛА.

При культивуванні на випробуваних середовищах гриб *Rhizopus* sp 2000 ФМ відрізнявся помірним ростом. На середовищі з соняшниковою олією у кількості 2 % при максимальному значенні ЛА рівень накопичення біомаси склав 2,0 г/л. Максимальний рівень біомаси спостерігався при культивуванні гриба на середовищі з 2% горіхової олії — 3,3 г/л, при порівняно невисокій ЛА — 15,2 од./мл. Прямої кореляції між рівнем накопичення біомаси грибом *Rhizopus* sp 2000 ФМ і ліполітичною активністю не встановлено. Ріст культури *Rhizopus* sp 2000 ФМ на середовищі із соняшниковою олією супроводжувався підкисленням середовища від рН 7,0 (на початку культивування) до 5,0.

Результати експериментів підтверджують, що соняшникова олія є ефективним індуктором біосинтезу екзоліпази. Високі значення ЛА на середовищі із сахарозою і крохмалем є показниками фізіолого-біохімічних особливостей гриба *Rhizopus* sp 2000 ФМ.

Максимальна активність ліпази *Rhizopus* sp 2000 ФМ відмічена при вирощуванні культури на середовищі з 1% соняшникової олії (58,33 од./мл). Збільшення концентрації даного компоненту до 2% і вище призводило до зниження ферментативної активності ферменту, але стимулювало ріст мікроміцета *Rhizopus* sp 2000 ФМ, що виявлялося у збільшенні накопичення біомаси.

Вплив джерел азоту на ріст та біосинтез екзоліпази грибом *Rhizopus* sp 2000 ФМ досліджували при культивуванні мікроміцету на рідких поживних середовищах з азотовмісними компонентами органічного та неорганічного походження: соєве борошно, лептон, казеїн та натрію нітрат, натрію нітрит, амонію сульфат, амонію хлорид, амонію ацетат, амонію карбонат, сечовина.

Результати, отримані після культивування *Rhizopus* sp 2000 ФМ показали, що найвища активність ліпази становила 294,9 од./мл і отримана на середовищі з вмістом соняшникової олії 1 % та соєвого борошна 2 %. Досить висока ЛА штаму *Rhizopus* sp 2000 ФМ була одержана на середовищі з вмістом соняшникової олії 1 % та 1 % казеїну — 65,35 од./мл. На середовищах з неорганічними джерелами азоту, включаючи нітрати та нітрити, активність ліпази відмічена у слідових кількостях.

На основі аналізу експериментальних даних для продуцента ліпази — гриба *Rhizopus* sp 2000 ФМ визначено склад вихідного поживного середовища, адаптованого за джерелами вуглецевого та азотного живлення, що забезпечує гарний ріст гриба та високий рівень біосинтезу ферменту культурою (%):

- соєве борошно — 2,0;
- соняшникова олія — 1,0;
- калій фосфорнокислий однозаміщений (KH_2PO_4) — 0,05;
- магнію сульфат (MgSO_4) — 0,05,
- калію хлорид (KCl) — 0,05.

Одним із етапів досліджень було встановлення оптимальних технологічних параметрів культивування продуцента *Rhizopus* sp 2000 ФМ: кількість посівного матеріалу, рН середовища культивування, температури культивування, об'єму середовища та інтенсивності перемішування.

ТЕХНОЛОГІЯ

На першому етапі наших досліджень проводили вивчення впливу швидкості перемішування і кількості поживного середовища на накопичення ферменту ліпази продуцентом *Rhizopus sp* 2000 ФМ (Рис. 1, 2).

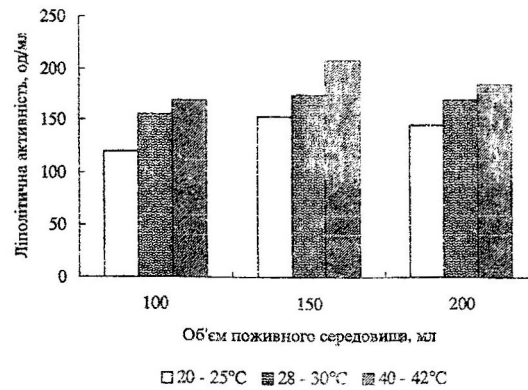


Рис. 1. Вплив температури та об'єму поживного середовища на біосинтез екзоліпази *Rhizopus sp* 2000 ФМ за швидкості перемішування 160 об/хв.

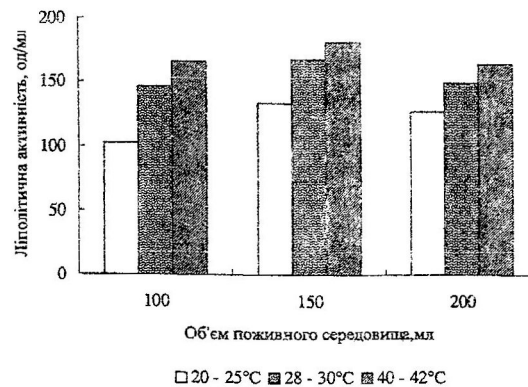


Рис. 2. Вплив температури та об'єму поживного середовища на біосинтез екзоліпази *Rhizopus sp*. 2000 ФМ за швидкості перемішування 220 об/хв

У результаті проведених експериментів встановлено, що збільшення об'ємів поживного середовища та інтенсивності перемішування спричиняють зниження синтезу ферменту, незалежно від температури культивування.

На наступному етапі наших досліджень проведено ряд експериментів із визначення впливу віку й оптимальної кількості інокуляту на накопичення ліпази в культуральній рідині *Rhizopus sp* 2000 ФМ (Рис. 3, 4). Для вирощування посівного матеріалу та ферментації використовували поживне середовище адаптоване за джерелами вуглецю та азоту.

Для визначення оптимального віку посівного матеріалу досліджуваного мікроміцета *Rhizopus sp* 2000 ФМ штам вирощували від 12 до 96 год. Через кожні 12 год визначали ліполітичну активність у культуральній рідині. Результати по визначенню оптимального віку інокулюму наведено на Рис 3. Встановлено, що оптимальний вік інокулюму для внесення у поживне середовище, складає 24 год. Тому подальші дослідження були направлені на встановлення оптимальної концентрації 1-добового інокулюму.

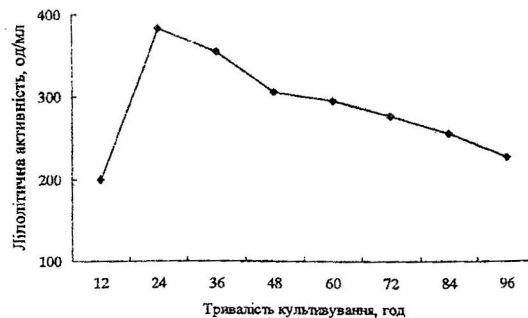


Рис. 3. Визначення оптимального віку інокулюму для культивування гриба *Rhizopus* sp. 2000 ФМ

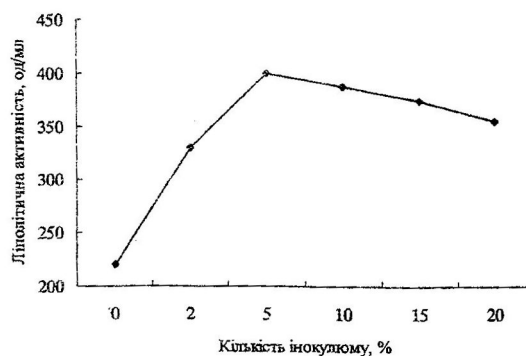


Рис. 4. Оптимальне значення кількості інокуляту для культивування гриба *Rhizopus* sp. 2000 ФМ

При визначенні оптимальної концентрації посівного матеріалу, що забезпечить для *Rhizopus* sp. 2000 ФМ максимальний рівень ліполітичної активності нами використовувався 24-годинний інокулюм у концентраціях від 0 до 15% до об'єму поживного середовища (Рис. 4).

Як видно з наведеного на Рис.4 найвища активність ліпази *Rhizopus* sp 2000 ФМ відмічена в результаті ферментації з використанням 5% інокулюму — 399,9 од/мл. Цей показник активності майже в 1,8 рази вищий за ліполітичну активність при культивуванні без інокуляту. При збільшенні кількості посівного матеріалу від 10 до 20% активність ліпази *Rhizopus* sp. 2000 ФМ знижувалась, що свідчить про недоцільність внесення більшої кількості інокулюму у поживне середовище культивування.

Висновки. 1. Вивчено фізіолого-біохімічні особливості досліджуваного штаму *Rhizopus* sp 2000 ФМ та підібрано склад поживного середовища для культивування продуценту позаклітинної ліпази. 2. Встановлено, що найвищий рівень ліполітичної активності у культуральній рідині *Rhizopus* sp 2000 ФМ досягається за швидкості перемішування 160 об/хв, температурі 40—42 °С та внесенні 5% 1-добового інокулюму. 3. Встановлено високу гідролітичну здатність ліпази 399,9 од/мл, синтезованої *Rhizopus* sp 2000 ФМ, що є важливою характеристикою ферменту для подальшого використання у харчовій промисловості при виробництві дієтичних продуктів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Айзенберг В.Л., Карпель В.И., Сырчин С.А., Капичон А.П. Апробация количественного метода определения липолитической активности с использованием хромогенного субстрата // Микробиол. журнал. — 1995. — Т.57. — № 5. — С. 84—89.

ТЕХНОЛОГІЯ

2. *Брокерхоф Х., Дженсен Р.* Липолитические ферменты. Пер. с англ. — М.: Мир, 1978. — 388 с.
3. *Грачева И.М.* Технология ферментных препаратов. М.: Элевар, 2000. — 512 с.
4. *Давранов К.Д.* Биокатализ — одна из наиболее инвестиционно привлекательных областей биотехнологии // Вестн. моск. ун-та. Сер. 2. Химия. — 2006. — Т. 47. — № 1. — 104 с.
5. *Кулаев И. С.* Бактериолитические ферменты микробного происхождения в биологии и медицине // Соросовский Образовательный Журнал. — 1997. — № 3. — С. 23—31.
6. *Кислухина О.В.* Ферменты в производстве пищи и кормов. — М.: ДеЛи принт, 2002. — 336 с.
7. *Синецкий С.В.* Разработка эффективных продуцентов липаз и новых технологий их использования // В мире науки. — 2006. — № 7. — С. 48—51.

Одержана редколлегією 09.02.2011 р.