

УДК 663.15.:577.15

**А.В. БОРИСЕНКО**, аспірант

**І.В. ЛИЧ**, к.б.н.

**М.М. АНТОНЮК**, к.т.н.

**В.Л. АЙЗЕНБЕРГ**, к.б.н.

*Національний університет харчових технологій, Київ*

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

**ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ГРИБА *RHIZOPUS SP.*  
2000 ФМ – ПРОДУЦЕНТА ПОЗАКЛІТИННОЇ ЛІПАЗИ  
OPTIMIZATION CONDITIONS FOR CULTIVATING FUNGUS  
STRAIN *RHIZOPUS SP.* 2000 FM – PRODUCERS OF EXTRACELLULAR  
LIPASE**

*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. Оптимальні умови культивування *Rhizopus sp.* 2000 ФМ: швидкість перемішування середовища 160 об/хв, температура вирощування 40 – 42°C та додавання 5% добового інокулюму.*

*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. Оптимальные условия культивирования *Rhizopus sp.* 2000 ФМ: скорость перемешивания среды 160 об/мин, температура выращивания 40 – 42°C и добавление 5% суточного инокулюма.*

*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. Optimal conditions for cultivating Rhizopus sp. FM 2000: move medium speed 160 rpm, growing at a temperature 40-42° C with adding 5% daily inoculum.*

*Ключові слова:* скринінг, мікроскопічні гриби, ліполітична активність, оптимізація, умови культивування.

Серед ряду біологічно активних речовин ферменти посідають одне із провідних місць у практичному застосуванні в різних галузях промисловості, народного господарства та медицини. Використання ферментів – біологічних каталізаторів – в народному господарстві вигідне як з економічної, так і з екологічної точок зору. Основну частину ферментів світового ринку складають гідролази [5].

Ліпази як гідролітичні ферменти представляють великий інтерес для багатьох галузей господарства, де необхідний частковий або повний гідроліз жирів та олій, зокрема, у харчовій промисловості. Успішним є використання ліпаз для очищення стічних вод від жирів, особливо каналізаційних комунікацій; при переробці побутових відходів; у сільському господарстві. Не менш перспективним є впровадження термостабільних ліпаз у вітчизняне виробництво миючих засобів [2].

Біотехнологічний спосіб отримання ферментних препаратів залишається найдоцільнішим економічністю та ефективністю. Тому закономірно, що у всьому світі науковці активно працюють у напрямку пошуку нових продуцентів ензимів серед мікроорганізмів, зокрема мікроскопічних грибів, які

залишаються ефективними продуцентами позаклітинної ліпази для промислових виробництв [4].

Визначальними факторами для 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 дослідження було встановлення впливу основних компонентів поживного середовища на рівень біосинтезу позаклітинної ліпази *Rhizopus sp.* 2000 ФМ, розробка оптимізованого поживного середовища за ознакою цільової (ліполітичної) активності продукту та оптимізація умов культивування *Rhizopus sp.* 2000 ФМ – перспективного продуцента екзоліпази.

### **Матеріали та методи досліджень**

Об'єкт дослідження – колекційний мікроміцет *Rhizopus sp.* 2000 ФМ, виділений зі зразка лісового ґрунту (Феофанія, Київ) у 2004 р. (Інститут мікробіології та вірусології НАН України), вперше використаний як продуцент ліпази.

Культивування гриба проводили глибинним способом з використанням 150 мл поживного середовища в колбах Эрленмейера (0,75 л) на кругових качалках з швидкістю обертання 160 та 220 об/хв при 26 – 28°C; 38 – 40°C та 42°C. У якості посівного матеріалу для ферментаційного середовища використовували 0,5 мл водної суспензії конідій грибних культур, вирощених на сусло-агарі упродовж двох тижнів. Для інокулюму та основного ферментаційного середовища вирощування мікроміцетів проводилось на підібраних середовищах (150 мл) глибинним способом.

Біомасу культур визначали ваговим методом за сухою масою міцелію. Культуральну рідину відокремлювали центрифугуванням, з подальшим

висушуванням до постійної маси міцелію в сушильній шафі за температури  $100 \pm 2^\circ\text{C}$ .

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 (за одиницю активності приймають таку кількість ферменту, що каталізує вивільнення 1 моль п-нітрофенола з емульгованого субстрату за 1 хв при  $37^\circ\text{C}$  [1]):

$$ЛА = \frac{\Delta E \times V_3}{\epsilon \times d \times V_n}$$

де, ЛА – ліполітична активність, нмоль/хв мл

$\Delta E$  – зміна величини екстинції за 1 хв;

$V_3$  – загальний об'єм реакційної суміші, мл;

$\epsilon$  – коефіцієнт екстинції п-нітрофенолу при зазначених умовах;

$\epsilon = 0,015$  нмоль;  $d = 0,5$  см;

$V_n$  – об'єм проби ферменту для реакції, мл;  $V_n = 10,1$  мл;

$$ЛА = 222,2 \times \Delta E$$

Всі експерименти проводились у трьох повторностях. У таблицях наведені 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 включається речовина, що може бути індуктором біосинтезу певного ферменту, у даному випадку жир, що міститься у рослинних оліях.

Для культивування гриба *Rhizopus sp.* 2000 ФМ використовували рідкі поживні середовища з мінеральною основою середовища Чапека та різними джерелами вуглецю у концентраціях 0,5; 1 та 2%. Вплив компонентів вуглецевого живлення на ліпазну активність та ріст досліджуваної культури визначали в експериментальній роботі при використанні різних джерел вуглецю: рослинних олій (соняшникової, оливкової, лимонної, ріп'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 в якості джерел вуглецю в різних концентраціях (0,5%, 1%, 2%) показали, що найбільш високий рівень ЛА в гриба досягнуто на середовищі із соняшниковою олією 1% – 58,33 од/мл. Присутність 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 гриба *Rhizopus sp.* 2000 ФМ 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 у якості джерел вуглецю були зафіксовані 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 ліполітичної активності не встановлено. Ріст культури *Rhizopus* sp. 2000 ФМ на середовищі із соняшниковою олією супроводжувався підкисленням середовища від 7,0 (рН середовища до культивування) до 5,0.

Результати експериментів свідчать на користь того факту, 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 – 58,33 од/мл для *Rhizopus* sp. 2000 ФМ відмічена на середовищі з 1% соняшникової олії, збільшення концентрації до 2% призводило до зниження ферментативної активності. Що стосується росту і накопичення грибом біомаси, то з додаванням більшої кількості соняшникової олії спостерігається стимуляція росту мікроміцета *Rhizopus* sp. 2000 ФМ.

Вплив джерел азоту на ріст та біосинтез екзоліпази грибом *Rhizopus* sp. 2000 ФМ досліджували при культивуванні гриба на рідких поживних середовищах з азотовмісними речовинами органічного та неорганічного походження: соєве борошно, пептон, 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 гриба становить 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 отримана 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.

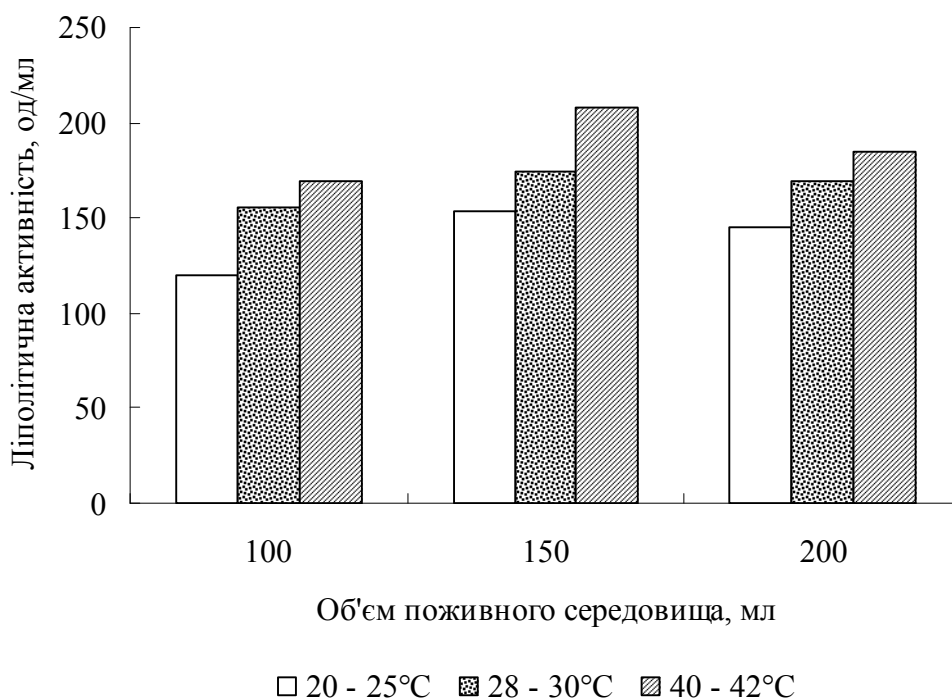
На основі аналізу експериментальних даних для продуценту ліпази – гриба *Rhizopus* sp. 2000 ФМ визначено склад вихідного поживного середовища,

адаптованого за джерелами вуглеводного та азотного живлення, що забезпечує гарний ріст гриба та високий рівень біосинтезу ферменту культурою гриба (%):

соєве борошно – 2,0;  
соняшникова олія – 1,0;  
калій фосфорнокислий однозаміщений ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) – 0,05;  
магнію сульфат ( $\text{MgSO}_4$ ) – 0,05,  
калію хлорид ( $\text{KCl}$ ) – 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 та інтенсивності перемішування середовища культивування.

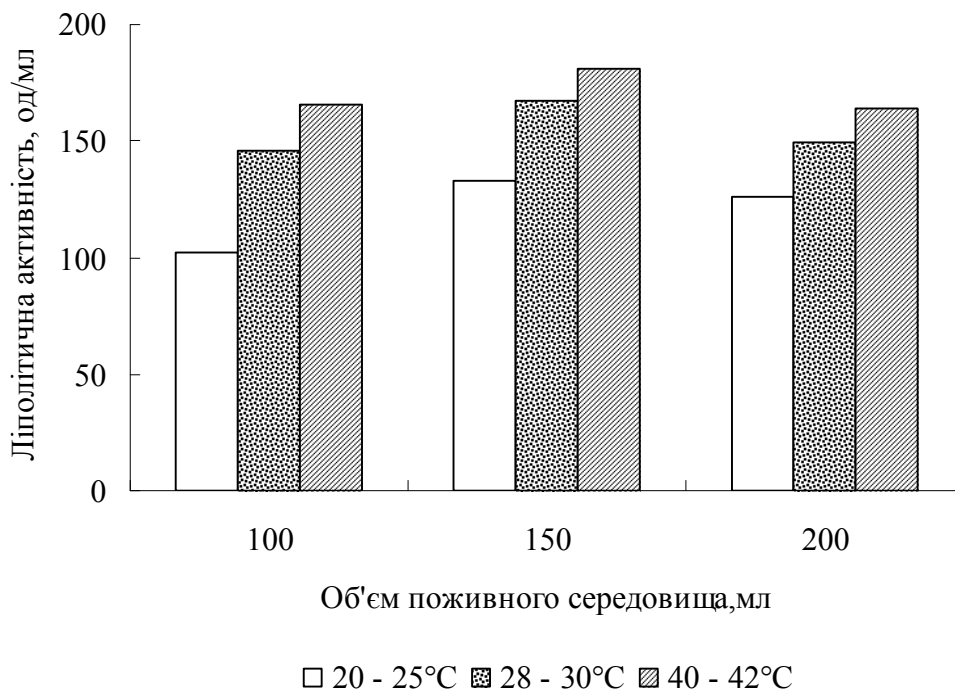
На першому етапі наших досліджень проводили вивчення впливу швидкості перемішування і кількості поживного середовища на накопичення ферменту ліпази продуцентом *Rhizopus* sp. 2000 ФМ (Рис. 1, 2).



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



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



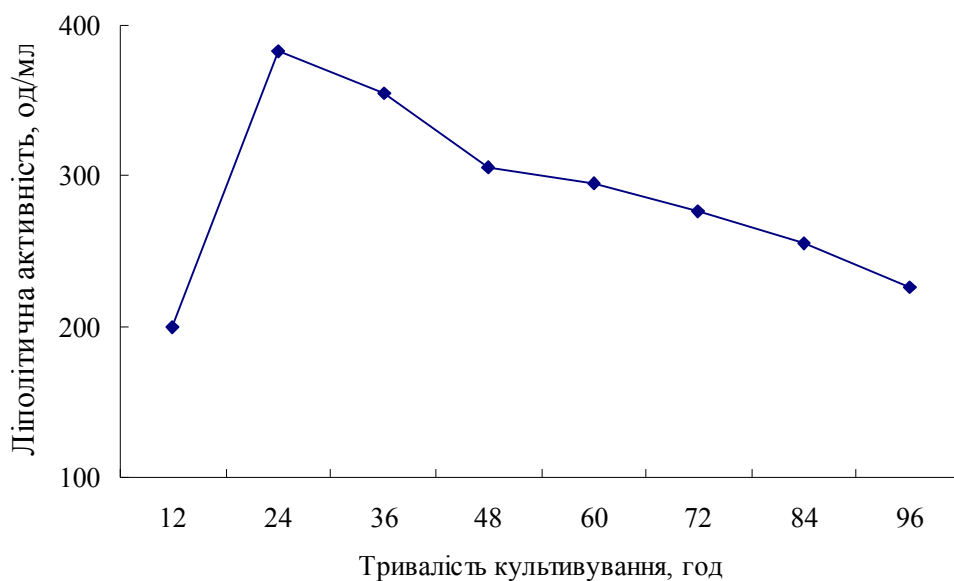
**Рис. 2.** Вплив температури та об'єму поживного середовища на біосинтез екзоліпази *Rhizopus* sp. 2000 ФМ за швидкості перемішування 220 об/хв

На наступному етапі наших досліджень проведено низку 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 годин. Через кожні 12 годин визначали ліполітичну активність в культуральній рідині. Результати по визначенню оптимального віку інокулюму наведені на Рис 3.

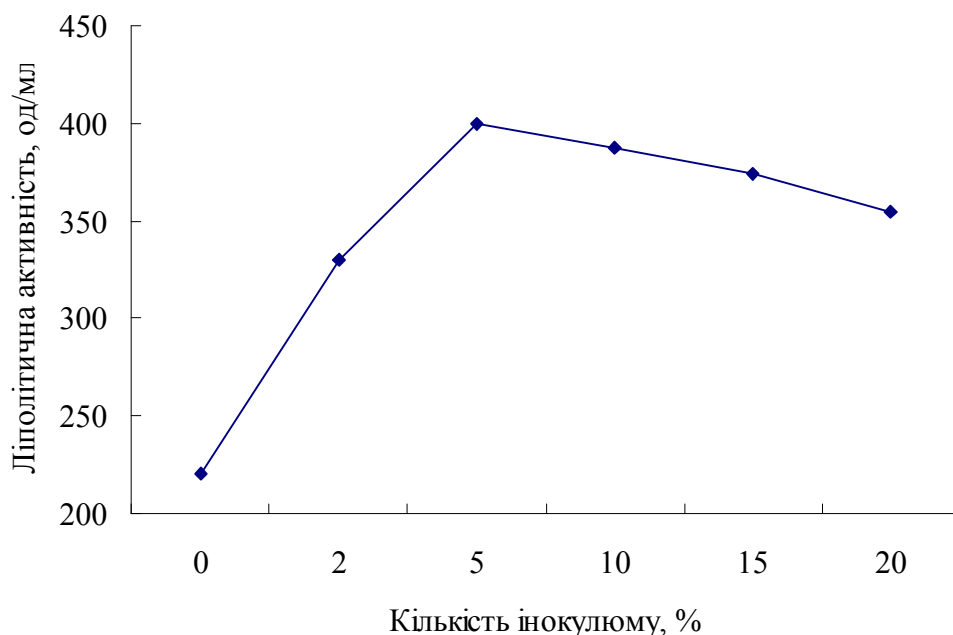
Як видно з даних, наведених на Рис.3 оптимальний вік інокулюму, необхідний для внесення в поживне середовище, складає 24 год. Тому подальші наші дослідження були направлені на встановлення оптимальної концентрації 1-добового інокулюму.





**Рис. 3.** Визначення оптимального віку інокулюму 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).



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

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. Отримано новий активний продуцент позаклітинної ліпази – термотолерантний гриб *Rhizopus* sp. 2000 ФМ з коротким циклом розвитку (максимум ліполітичної активності – 437,7 од/мл вже на 48 год культивування).

2. Встановлено, що найвищий рівень ліполітичної активності в культуральній рідині *Rhizopus* sp. 2000 ФМ був відмічений за швидкості обертання качалки 160 об/хв, температури 40 – 42°C і оптимального об'єму поживного середовища 150 мл. Максимальний рівень активності ферменту досягався при додаванні 5% 1-добового інокулюму.

3. Вивчено фізіолого-біохімічні особливості досліджуваного штаму, підібрано склад поживного середовища для культивування продуценту позаклітинної ліпази та оптимізовано основні параметри його культивування. Встановлена висока гідролітична здатність нової ліпази по відношенню до різних рослинних олій, що є важливою характеристикою ферменту для 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.
2. Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты. Пер. с англ. – М.: Мир, 1978.– 388 с.

3. *Грачева И.М.* Технология ферментных препаратов. – 3-е изд., перераб., доп. 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. *Синеокий С.В.* Разработка эффективных продуцентов липаз и новых технологий их использования //В мире науки. – 2006. –№7. – С. 48-51.

*Одержана редколегією 09.02.2011р.*