

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ, ІНЖЕНЕРІЇ І ТЕХНОЛОГІЙ  
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ  
Завідувач випускової кафедри  
\_\_\_\_\_ М.М. Барановський  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 р.

## ДИПЛОМНА РОБОТА

(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)

ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ “БАКАЛАВР”  
СПЕЦІАЛЬНІСТЬ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»  
ОСВІТНЬО-ПРОФЕСІЙНА ПРОГРАМА «ЕКОЛОГІЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА  
БІОЕНЕРГЕТИКА»

**Тема: «Вивчення ферментних комплексів продуцентів *Rhizopus tritici* та  
*Rhizopus oryzae* з метою застосування в біотехнології»**

Виконавець: студент 403гр. ФЕБІТ

Вітюк І.Р.

Керівник: к.б.н., доцент кафедри біотехнології

Петюх Г.П.

Нормоконтролер:

Дражнікова А.В.

КИЇВ 2021

# НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії і технологій

Кафедра біотехнології

Напрямок: 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач випускової кафедри

\_\_\_\_\_ М.М. Барановський

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 р.

## ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

**Вітюка Івана Руслановича**

1. Тема дипломної роботи: «**Вивчення ферментних комплексів продуцентів *Rhizopus tritici* та *Rhizopus oryzae* з метою застосування в біотехнології**» затверджена наказом ректора від « 11 » травня 2021 р. № 715 /ст.
2. Термін виконання роботи: з 10 травня 2021 р. до 20 червня 2021р.
3. Вихідні дані роботи: були проаналізовані літературні джерела стосовно продуцентів *Rhizopus tritici* та *Rhizopus oryzae*.
4. Зміст пояснювальної записки: Вступ. Літературний огляд. Об'єкти та методи дослідження. Експериментальна частина. Висновки. Список бібліографічних посилань використаних джерел.
5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: 7 таблиць.

## 6. Календарний план-графік

№	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Літературний огляд та збір інформації за темою: «Вивчення ферментного комплексу продуцентів <i>Rhizopus tritici</i> та <i>Rhizopus oryzae</i> з метою застосування в біотехнології	11.05.21-14.05.21	
2	Ознайомлення з методикою виконання дипломної роботи	12.11.20-15.11.20	
3	Написання основної частини	13.05.21-20.05.21	
4	Формулювання висновків та рекомендацій	24.05.21-27.05.21	
5	Перевірка дипломної роботи керівником	27.05.21-28.05.21	
6	Кінцеве оформлення роботи	28.05.21-02.06.21	
7	Попередній захист дипломної роботи	03.06.21	
8	Захист дипломної роботи	17.06.21	

7. Дата видачі завдання: «10» травня 2021 р.

Керівник дипломної роботи \_\_\_\_\_ Петюх Г.П.

Завдання прийняв до виконання \_\_\_\_\_ Вітюк І.Р.

## РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Вивчення ферментного комплексу продуцентів *Rhizopus tritici* та *Rhizopus oryzae* з метою застосування в біотехнології»: 50 сторінки, 7 таблиць, 42 використаних джерел.

**Мета дипломної роботи** – вивчення ферментного комплексу продуцентів *Rhizopus tritici* та *Rhizopus oryzae* з метою застосування в біотехнології.

**Об'єкт дослідження** – технологія отримання ліпази з мікроскопічного гриба *Rhizopus oryzae*.

**Предмет дослідження** – *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus tritici*.

**Методи дослідження** – аналітичні та математичні.

**Анотація.** В данній роботі було розглянуто властивості ферментних комплексів таких мікроскопічних грибів, як *Rhizopus oryzae* та *Rhizopus tritici* та їх можливе використання в біотехнології. Представленні мікроскопічні гриби мають широкий спектр позитивних властивостей а саме дають можливість налаштувати виробництво глюкоамілаз та ліпаз, сприяють налаштуванню синтезу органічних кислот. Також багато штамів *R. oryzae* виробляють ряд ферментів, що перетравлюють вуглеводи та беруть участь у перетворенні стероїдів, як наслідок має корисний вплив на ферментаційну промисловість. Зокрема цей мікроскопічний гриб виробляє лактат із глюкози на високому рівні ,який використовується як харчова добавка. Одним із найважливіших факторів розгляду представлених грибів є отримання ліполітичних ферментів. Ліполітичні ферменти представляють цінність для таких галузей ,як біотехнологічна, олеохімічна , текстильна, харчова та для медицини.

Було розглянуто специфічність дії, чим саме корисні данні ферменти, повністю описали їх промислове використання та проаналізували

*ЛІПАЗА, RHIZOPUS ORYZAE, RHIZOPUS TRITICI, КУЛЬТИВУВАННЯ, ФЕРМЕНТАЦІЯ*

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	9
1.1. Синтез ліполітичних ферментів мікроорганізмами.....	9
1.2. Характеристика властивостей мікробних ліпаз.....	11
1.2.1. Виділення та очистка препаратів ліпази.....	11
1.2.2. Фізико-хімічні властивості та особливості будови нативних ліпаз.....	14
1.2.3. Специфічність дії мікробних ліпаз.....	16
1.3. Імобілізація ліполітичних ферментів.....	19
1.4. Практичне використання ліполітичних ферментів.....	23
1.5. Висновки до розділу.....	27
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	28
2.1. Особливості виділення ліпази з <i>Rhizopus oryzae</i> .....	28
2.2. Методи визначення ліполітичної активності.....	28
2.2.1. Визначення активності ліпази титриметричним методом.....	28
2.2.2. Визначення активності ліпази рН методом.....	29
2.3. Методи визначення активності супутніх ферментів.....	29
2.4. Методи кількісного визначення вмісту білка.....	30
2.5. Отримання препаратів ліпази різної чистоти.....	30
2.6. Електрофоретичне дослідження препаратів ліпаз.....	32
2.6.1. Метод гельфільтрації.....	32
2.6.2. Метод електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності SDS.....	32
2.7. Ізоелектричне фокусування ліпаз.....	32
2.8. Визначення амінокислотного складу ліпаз.....	33
2.9. Модифікація ліпази специфічними інгібіторами.....	33
2.10. Методи іммобілізації ліпази.....	34
2.11. Висновки до розділу.....	34

РОЗДІЛ 3. ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТІВ ЛІПАЗА RHIZOPUS ORYZAE 1403, ВИВЧЕННЯ ЇХ ФРАКЦІЙНОГО СКЛАДУ І ФІЗИКО ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ.....	35
3.1. Отримання технічних препаратів ліпази.....	35
3.2. Отримання високоочищених ферментних препаратів ліпази.....	41
3.3. Фізико хімічні властивості ізоферментів ліпази I та ліпази II.....	43
3.3.1. Дослідження амінокислотного складу ліпаз.....	43
3.3.2. Вплив рН і температури на активність ізоферментів.....	45
3.4. Висновки до розділу.....	45
ВИСНОВКИ.....	46
Список використаних бібліографічних посилань.....	47

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Ліполітичні ферменти завжди викликали інтерес вчених у зв'язку зі своїми унікальними властивостями. А саме дія на поверхності розділу фаз, різноманітність субстратної специфічності, здатність каталізувати як гідроліз тригліцеридів, так і зворотні реакції в мікродводних умовах.

Ферментативний гідроліз жирів має безсумнівні переваги по порівнянню з хімічним розщепленням. Крім фізіологічного значення він використовується людиною для отримання гліцерину і жирних кислот, видалення жирових домішок. За допомогою позиційно-специфічних ліпаз можна здійснити виборчий гідроліз, який дозволяє отримувати моно та дигліцериди, а також змінювати функціональні властивості природних жирів, що важливо для деяких технологій. Дослідження в області ферментативного каталізу, реакцій етерифікації відкрили нові можливості використання ліпаз.

Таким чином, ліполітичні ферменти представляють цінність для багатьох галузей промисловості (біотехнологічної, олеохімічної, текстильної, шкіряної, харчової), для медицини і як біохімічні реагенти.

Однак, впровадження ліпаз у виробництво стримувалося у зв'язку з їх високою вартістю. Можливість іммобілізації ферментів в більшій частині вирішило цю проблему. Тому в останнє десятиліття дослідження ліпаз розвернулось в більшому масштабі.

Незважаючи на безліч робіт, присвячених ліпазам, важко назвати такі, в яких вони охарактеризовані досить повно з точок зору властивостей і структури білка, будови активного центру, каталітичної дії, специфічності, кінетичних і термодинамічних характеристик. Тому проблема глибокого вивчення властивостей нативних і іммобілізованих препаратів ліполітичних ферментів і розробка науково

обґрунтованих підходів до їх застосування є актуальною в теоретичному і практичному відношенні.

**Мета і завдання дослідження.** Мета роботи - отримання препаратів ліпази *Rhizopusoryzae* 1403, іммобілізація ферменту, дослідження фізико-хімічних властивостей нативної та іммобілізованої ліпази.

Вирішувалися наступні завдання:

- розробка технології отримання ферментних препаратів ліпази з різними ступенями очищення;
- встановлення фракційного складу ліполітичного комплексу продуцента;
- дослідження деяких властивостей ізоферментів ліпази;
- вивчення каталітичних властивостей ліпази;
- ідентифікація функціональних груп активного центру;
- визначення кінетичних характеристик гідролізу три-гліцеридів;
- вивчення специфічності дії;
- іммобілізація ліпази хімічними та фізичними способами.



## РОЗДІЛ 1

### ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

#### 1.1. Синтез ліполітичних ферментів мікроорганізмами

Відповідно до сучасних уявлень ліпази - це ферменти, здатні гідролізувати довголанцюгові триацилгліцерини [1].

Сьогодні ліпази активно досліджуються в усьому світі. За останніми статистичними даними вони складають 25% всіх ферментів, використаними в біотехнології. Це пов'язано не тільки з їх біологічною роллю в метаболізмі ліпідів, а й використанням в якості біокатализаторів для вирішення широкого спектра практичних завдань. Всі зростаючі потреби народного господарства в ліполітичних препаратах з високою активністю і низькою собівартістю роблять найбільш перспективним їх виробництво з допомогою мікробного синтезу. Перевага такого способу полягає в тому, що на доступних поживних середовищах за короткий термін можна отримати препарати з високою активністю і різноманітними властивостями [2].

Як показують дослідження, ліпази здатні синтезувати багато мікроорганізмів, які виділяються з різних джерел – скам'янілих смол, ґрунту, водних басейнів, плодів рослин, харчових продуктів [3]. Як правило, ліполітичні ферменти є позаклітинними, що багато в чому спрощує технологію отримання препаратів.

Можна виділити найбільш цінні для біотехнології продуценти ліпаз. Це *Rhizomii c ormiehei*, *Rhizopiis niveus*, *Rh. Oriyzae*, *Rh. arrhizus*, *Rh. delemar*, *Geotrichum candidum*, *Humicola lanuginosa*, *Penicillium roqueforti*, *P.camambertii*, *Candida rugosa*, *Cantarctic a*.

Ці ферменти глибоко вивчені, промисловістю випускаються відповідні препарати в розчинному та іммобілізованому вигляді: Novozyme 435 (*Candida antarctica*) [4], Amano Enzyme Ltd (*Candida rugosa*) [5], Lipozyme 20 (*Rhizomucor miehei*). Вони використовуються переважно в олійно-жировій промисловості.

Інтерес до ліпази з *Geotrichum candidum*, *Penicillium roqueforti*, *P. camambertii*, *P. expansum*, *P. candidum*, *P. cyclopium*, *P. simplicissimum*, *P. citrinum* пов'язаний з унікальною здатністю гідролізувати жир в молочних продуктах, відщеплення визначеної жирної кислоти. Таким чином створюється специфічний смак і аромат сиру, масла.

Активно синтезують ліпази дріжджі. Найвідомішими в цьому відношенні є *Candida rugosa*, *C. Antarctica*, *C. parapsilosis*, *Yarrowialipolytica*.

Вивчено структуру цих ферментів, субстратну специфічність [6]. Препарати ліпази з *C. antarctica* широко використовуються для синтезу найрізноманітніших ефірів.

Вивчення ліполітичних ферментів бактерій трактується різнобічними проблемами, з якими стикається людина. У деяких видів – *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermis*, *S. Aureus*, *S. simulans*, *Pseudomonas aeruginosa*. Ліпазна активність в поєднанні з іншими ферментами є фактором патогенності. Ці ліпази вивчаються з точки зору біологічної еволюції. Багато з них клоновані в клітинах інших бактерій, вивчена їх первинна і третинна структура. Але і в практичній діяльності людини бактеріальні ліпази займають далеко не останнє місце. Добре відомий продуцент ліпази *Chromatobacterium viscosum* [7], виділений з ґрунту. Важливою особливістю цього ферменту є здатність гідролізувати ліпіди з високою температурою плавлення.

В останні роки з'явилися роботи, присвячені екстремальним видам мікроорганізмів, ліпази яких активні в лужному середовищі рН 9-10, при низьких (від мінус 2°C до +10°C) та високих температурах (50-60°C). Це бактерії з родів *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Fusarium*, *Pseudomonas* [8]. З *Bacillus tearothermophilus* виділена ліпаза, що проявляє високу активність при 60-75°C [9]. Виявлено високий

рівень біосинтезу ліпази психо-профільним грибом – *Typhulaishikariensis* з оптимум температури 15°C і рН 8,0 - 9,0. Видом *Monascus faluginosus* утворюється ліпаза з температурою дії 50°C .

Такі ліпази необхідні для переробки жирової сировини з високою температурою плавлення. Вони дають можливість повної заміни синтетичних детергентів, що створюють екологічні проблеми.

Вивчено ліпази інших продуцентів: грибів роду *Fusarium*, бактерій *Coiynebacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, актиноміцетів *Newospora*, *Streptomyces*.

З метою підвищення активності та цілеспрямованої специфічності ліполітичних ферментів в даний час широко використовують методи генної інженерії. Проведено клонування та експресію генів ліпаз видів *Rhizopus*, *Geotrichumcandidum*, *Thermomyceslanuginosa* в дріжджах *Pichiapastoris*, а ліпаз роду *Staphilococcus*- в бактеріях *E. coli*. Специфічна активність при цьому зростає в десятки разів [10].

Поряд з цим проводиться пошук нових продуцентів. Наприклад, з'явилися повідомлення про *Mucorhiemalisf. hiemalis*, виділеного з плодів пальми.

Така робота необхідна в біотехнології, так як будь-яка галузь застосування ліполітичних ферментів має свої особливості, що вимагає широкого вибору препаратів.

## **1.2. Характеристика властивостей мікробних ліпаз**

### **1.2.1. Виділення та очистка препаратів ліпази**

Для глибокого вивчення характеристик ферментних препаратів необхідно отримувати їх в чистому вигляді. Ступінь чистоти впроваджується обсягами виробництва та призначенням препарату, тому очистку проводять на 3-х різних рівнях: біотехнологічному, фізико-хімічному і тонкому хімічному [11].

Отримання ферментних препаратів з глибинної культури продуцента проводиться на основі фільтратів культуральної рідини. Спочатку вони стабілізуються солями та

концентруються виморожуванням, діалізом, ультрафільтрацією. Потім їх осаджують органічними розчинниками (ацетон, ізопропанол, етанол) і нейтральними солями (частіше за все сульфатом амонію) [12].

В промисловості для концентрування ферментних розчинів використовується вакуумне випарювання. Як показує практика, при оптимальних умовах воно дозволяє отримати розчин ферменту, що містить не менше 90% первісної активності. Наприклад, при вакуумвипарюванні нейтральної протеїнази *Bacillus subtilis* втрати активності не перевищували 10%. Цього вдалося досягти за рахунок підтримки температури кипіння ферментного розчину на рівні оптимальної (20-25°C) [13].

Для ферментного розчину пектин гідролази *Aspergillus alliaceus* оптимальна температура випарювання склала 30° С, а підвищення її до 40 ° С збільшувало втрати активності на 5% [14].

В процесі вакуум випарювання відбувається очистка ферментів від деяких баластних речовин шляхом випадання їх в осад.

Однак більшість ферментів дуже чутливі до впливу підвищення температур випарювання і тому в нинішній час є тенденція до застосування різних способів, виключають теплову денатурацію білків. Широке поширення отримали методи мембранного поділу, а зокрема, зворотній осмос, ультра та мікрофільтрація, тонка фільтрація. Визнаним вважається метод ультрафільтрації. Ні одне сучасне виробництво ферментів не може обійтися без ультрафільтраційних установок. Даний метод технологічний і ефективний, дозволяє отримувати ферментні концентрати при одночасному звільненні від баластних речовин (пігментів, азотистих та інших низькомолекулярних з'єднань). Втрати ферментативної активності мінімальні. Перевагами також являється економічність і дешевизна процесу, що обумовлено простотою установок і їх малою енергоємністю [15].

Відомі дослідження ультрафільтрації супернатантів культуральної рідини ліпази з *Serratia marcescens* через порожнисті волокна з межею пропускання пір 15 кДа. Велика частина супутніх білків при цьому поступила в фільтрат. При 10-кратному (по об'єму) концентрації культуральної рідини проводилось тестування

близько 70-75% ліпазної активності з одночасним очищенням ліпази в 4-5 рази [16].

Попередньо сконцентровані та очищені розчини ферментів висушують сублімацією або розпиленням для отримання технічних препаратів. Традиційно застосовується в промисловості розпилювальна сушка при підвищених температурах теплоносія, що призводить до втрат ферментативної активності до 10-15%. Вирішенням цієї проблеми можливо знайти в застосуванні вакуум сублімаційного методу висушування, котрий дозволяє уникати значної інактивації ферментів і повністю зберігати їх нативні властивості [17].

Однак частіше всього виділення ферментів проводять осадженням з використанням органічних розчинників або висолюванням сульфатом амонію. Високоочищені ферментні препарати отримують в наслідок об'єднання методів хроматографії, включаючи: гелеву, іонообмінну, та гідрофобну. При цьому вибір способів фракціонування є індивідуальним для кожного ферменту і визначається експериментально.

Способи фракціонування білків засновані на відмінностях молекулярної маси та заряду. Ефективність процесу поділу визначається вибором сорбентів і їх поєднанням. В нинішній час для поділу білків вже стали традиційними гелі (сефадекси), іонообмінні смоли (DEAE Cellulosa, CM Cellulosa), гідрофобні (Sepharsa, Sephacryl), так і нові полімери.

Для кожного ферменту розробляється унікальна схема очищення. На перших етапах отримання високоочищених ферментних препаратів ліпаз зазвичай використовують ультрафільтрацію (іноді у два етапу), фракціонування сульфатом амонію, осадження органічними розчинниками. Ліпази з *Penicillium roqueforti* осаджували етанолом [18], з *Pseudomonas pseudoalcaligenes* - ацетоном.

Схеми очищення мікробних ліпаз відрізняються послідовністю стадій, способами елюції. При отриманні високоочищених препаратів ліпаз *Yarrowia*, *Penicillium*, *Fusarium* спочатку використовували іонообмінну хроматографію на DEAE-Toyopearl 650M, CM-Toyopearl 650M, а потім гідрофобну на Phenil-Toyopearl 650M, Butyl-Toyopearl 650M ліпаза з *Fusarium*sp. УМ-30 була очищена у 2770 раз з

виходом 37%.

Як висновок можна, можливо відзначити, що для кожного продуцента ферменту необхідні дослідження по виділенню його в високоочищеному або гомогенному стані зі збереженням нативних властивостей.

### 1.2.2. Фізико хімічні властивості і особливості будови нативних ліпаз

Індивідуальні характеристики ліпаз залежать від особливостей продуцента. Фізико-хімічні властивості ліпаз можуть значно відрізнятися навіть у мікроорганізмів одного роду, що пов'язано з видовими, а іноді й штамовими відмінностями.

Основні фізико-хімічні показники найбільш вивчених мікробних ліпаз приведені в табл.1.1. Більшість з них мають рН оптимум в слабнокислій, нейтральній або слаболужній зонах; температуру дії в межах 32-45° С. Деякі мають стійкість до лужних значень рН (9-12) та стабільність до високих температур. Невелика група ферментів проявляє активність при низьких температурах від 2 до 15°С. Це явище незвичайне, але зрозуміле, тому що реакції можуть протікати з великою швидкістю завдяки різним фазовим переходам у твердий стан що беруть участь в реакції компонентів [23].

Молекулярна маса багатьох ліпаз мікробного походження коливається в інтервалі 25-72 кДа, хоча зустрічаються і високомолекулярні - 120-160 кДа, що є результатом асоціації низькомолекулярних форм білкових молекул. Питома активність ліпаз може складати сотні та десятки тисяч (табл. 1.1).

Значення рН свідчать, що вони можуть бути як кислими, так і нейтральними білками. Багато ліпаз активуються іонами Са, Mg, Ва, та інгібуються ЕДТА, але загальним правилом це не є. Солі жовчних кислот можуть також виступати як активаторами, так і інгібіторами. Навідміну від багатьох ліпаз *Rhizomucor miehei* активується органічними розчинниками, що необхідно в процесі синтезу.

Таблиця 1.1

Фізико-хімічні властивості ліпаз мікробного походження

Продуценти ліпаз	Оптимальні умови дії		Збереження активності		Активатори	Інгібітори
	pH	Т-ра, °C	pH	Т-ра, °C		
Бактерії <i>Serratia liquefaciens</i>	8,0	44		<50	Ca <sup>2+</sup> ,Mn <sup>2+</sup> ,Ba <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> ,ЕДТА

Продовження таблиці 1.1

<i>Serratia marcescens</i>	8,0	45	8,0-8,5	30-55	хн, дхн	ЦТАБ
Гриби <i>Rhizopus microspores</i> ВКЛ-А	5,5-9,0	40	4,0-9,0	<65	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	Солі 1 і 2-х валентних металів, Hg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , ХН і ДХН
<i>Rhizopus oryzae</i>	4,5-9,0	38	4,0-9,0	<65		
<i>Rhizopus oryzae</i>	7,0	37	6,0-8,0	25-50	Ca <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup> Fe <sup>2+</sup> Fe <sup>3+</sup> ,Mg <sup>2+</sup>
<i>Rhizomucor miehei</i>	7,0	65	—	<65	етанол, ацетон	Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , ЕДТА
<i>Mucor hiemalis</i>	7,0	40	4,0-9,0	45 (15)	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> ,Mn <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup>	Fe <sup>3+</sup> ,Cu <sup>2+</sup> ,Ba <sup>2+</sup> , Тритон X-100, Твін- 20
<i>Aspergillus oryzae</i>	7,0	30	6,0-9,0	<30		Ag <sup>+</sup> ,Fe <sup>3+</sup> ,Cu <sup>2+</sup> ,Zn <sup>2+</sup>
Дріжджі: <i>Candida lipolytica</i>	7,5	40		8	Sr <sup>2+</sup> ,Ba <sup>2+</sup> ,Zn <sup>2+</sup> ,Mg <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup>

Завдяки розвитку техніки виділення та очищення отримали переконливі докази, що синтезовані мікроорганізмами ліполітичні ферменти мають множинні молекулярні форми, які по своїм властивостям далеко не ідентичні.

Наприклад, гриб *Penicillium sp.* може секретувати дві форми ліпази з близькими властивостями: оптимуму pH 7,2-7,8 і температури 35-37° C.

В нинішній час проводяться численні дослідження по розкодуванню будови активного центру мікробних ліпаз, особливостей їх дії, поверхневої активації. Встановлено, що більшість ліполітичних ферментів діють як серинові гідролази з тріадою Ser-Gis-Aspв активному центрі [24].

Порівняння тривимірних структур ліпаз людської підшлункової залози та гриба *Rhizomuco rmiehei* виявило каталітичну тріаду Ser-Asp-His, подібну серинових протеазам. Згодом рентгеноструктурний аналіз ліпаз *Pseiidomonas ghimae*, *Humicolala nuginosa*, *Rhizopu sdelemar*, *Penicillium camembertii*, *Candida aiitarctica*, і кутінази *Fu sar iumsolanipisi* вказав на їх подібну каталітичну будову. Кислотний залишок аспарагінової кислоти тріади в гідролітичних ферментах, каталізують розщеплення складних ефірів, може бути замінений глютамінової, як показано при визначенні структури ліпази *Geotrichum candidum*, *Candida rugosai* ацетилхолінестерази *Torpedoc a lifornica*. Консервативна заміна Glu на Asp в рекомбінантні ліпазі *Geotrichum candidum* не змінила дію на триолеїн, у порівнянні з нативною ліпазою. Залишки каталітичної тріади завжди розташовані в однаковому порядку в первинній структурі: Ser, (Glu/Asp), His. Однак ліпаза *Bacillus subtilis* становить виняток, маючи Ala-Xxx-Ser-Xxx-Gly елемент навколо активного серина. ікаво, що при відновленні Gly-XxxSer-Xxx-Gly «елемента ліпази» з допомогою сайтонаправленого мутагенезу специфічна активність була порівнянна з нативним ферментом.

### 1.2.3. Специфічність дії мікробних ліпаз

Специфічність дії ліполітичних ферментів включає: I- субстратну, тобто здатність гідролізувати складноефірні зв'язки в різних тригліцеридах та інших субстратах; позиційну, тобто здатність гідролізованих в тригліцеридах або тільки первинні, або й первинність і вторинність зв'язку; 3-стереоспецифічність (впізнавання sn-1 і sn-3 позицій тріацілг-ліцерінов).

Основна кількість ліпаз мікроорганізмів виявляють більш високу активність на природних субстратах, ніж на синтетичних [25].



Відмінною особливістю ліполітичних ферментів є те, що їх специфічність визначається не тільки хімічною природою субстрату, але і його фізичним станом. Вони здатні здійснювати гідроліз субстрату на міжфазній поверхні, будучи розчиненими в одній фазі і діючи на нерозчинний субстрат.

Існують ліпази, специфічність яких проявляється у відношенні жирів, тобто знаходяться в твердому, а не в емульгованому стані.

При з'ясуванні субстратної специфічності ліпази *Blakeslea trispora* було встановлено, що її активність зменшується в наступного ряду олій: кукурудзяна > оливкова > соняшникова > бавовняне [26].

Для більшості мікробних ліпаз здатність до гідролізу моно-, ди- та тригліцеридів можна, можливо, поставити в такій послідовності: три->ди>моногліцериди. Висока спорідненість до моно- і дигліцеридів проявляється лише деякими мікробними ліпазами. Так, ліпаза з *Bacillus stearothermophilus* здатна гідролізувати тільки моногліцериди на відміну від ліпаз *Fusarium sp.* і *Aspergillus oryzae*, які активні в відношенні як моно-, так і дигліцеридів.

Характерною для ряду ліполітичних ферментів є стереоспецифічність, тобто специфічність до більш швидкого гідролізу первинних SN-ефірів у порівнянні з іншими стереоізомерами.

Згідно позиційної специфічності мікробні ліпази ділять на дві групи. Ферменти першої групи не мають позиційної специфічності і вивільняють жирні кислоти зі всіх трьох положень гліцерину і здатні наражати гліцериди тотальному гідролізу. Реакція, каталізована специфічними ліпазами, виглядає так:

Характерними для позиційно неспецифічних ліпаз є поява гліцерину в реакційній суміші вже на початковому етапі гідролізу. Такі ліпази були виділені з *Geotrichum candidum*, *Aspergillus sp.*, *Oosporalactis*, *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*.

Друга група ліпаз звільняє жирні кислоти позиційно специфічно. Специфічність дії таких ліпаз пов'язана з першим і третім положеннями ацилгліцеринів, які гідролізуються з 1,2 (2,3) - діацилгліцеринів, а також з 2 - моноацилгліцеринів.

До групи 1,3 специфічних ферментів відносяться ліпази з *Rhizopus arrhizus*, *M*

*Mucor miehei*, *Aspergillus niger*, *Candida cylindracea*, *Cromobacterium viscosum*, *Pseudomonas sp.*

Специфічність тільки до ефірних зв'язків виявлена у ліпази *Pseudomonas fluorescens*. Основними продуктами внаслідок ліполізу в цьому випадку є 2 моногліцериди та вільні жирні кислоти [27].

По відношенню до жирних кислот в тригліцеридах мікробні ліпази не мають суворої специфічності, однак, є відмінності в швидкості їх гідролізу. Деякими ліпазами швидше гідролізуються тригліцериди, жирні кислоти з коротким вуглецевим ланцюжком (C4Cs), другими - з довгою (цю-3гор), існують і такі, які однаково добре гідролізують весь спектр жирних кислот.

Наприклад, ліпаза *Botrytis cinerea* високо специфічна до синтетичних субстратів, що містять довголанцюгові ненасичені жирні кислоти.

Причина залежності активності деяких ліпаз від довжини ланцюжка, ступеня ненасиченості жирної кислоти або положення подвійний зв'язку жирнокислотного залишку залишається неясною. Певна роль належить обмеженням обертального руху, яке є істотним для утворення фермент-субстратного комплексу.

Ряд мікробних ліпаз не проявляють суворої специфічності до довжини жирнокислотного залишку і активно гідролізують тригліцериди жирних кислот, мають 8 атомів вуглецю. До таких ферментів відносяться ліпази *Penicillium cyclophun*, *Rhizopus arrhizus*, *Fusarium oxysporum*.

Ліпаза з *Aspergillus niger* специфічна по відношенню до жирних кислот. Крім того, було встановлено перевагу до ненасиченим жирним кислотам, що пояснюють фазовим станом послідних при температурі експерименту. Високу вибірковість до жирних кислот з коротким ланцюгом проявляла ліпаза з *Mucor miehei*.

Ліпази *Geotrichum candidum*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida rugosa*. Ліпаза з *Candida lipolytica* використовувалася для вилучення пальмітинової кислоти з пальмового масла, при цьому її вихід становив 50%.

Для ліпаз *Geotrichum candidum*, *Vibriosp.*, *Rhizomucor* відзначають високу специфічність до поліненсиченим жирним кислотам.

Широкий спектр впливу мікробних ліпаз на природні та синтетичні субстрати, унікальність їх специфічного дії і фізико-хімічних властивостей надає можливість для використання цих ферментів в найрізноманітніших галузях народних господарств, наукової і практичної діяльності людини.

### **1. 3. Іммобілізація ліполітичних ферментів**

Іммобілізація - це включення молекул ферменту в якусь ізольовану фазу, яка відокремлена від фази вільного розчину, але здатна обмінюватися з молекулами субстрату, ефектора або інгібітора. Приєднання ферменту до носія має ряд переваг. Іммобілізовані ферменти легко видаляти з реакційної суміші простою фільтрацією. Вони використовуються багаторазово, що економічно доцільно, незважаючи на витрати, пов'язані з іммобілізацією. В процесі дослідження таких ферментів виявилось, що багато з них більш стійкі до зовнішніх впливів, ніж вільні.

Однак іммобілізація часто призводить до істотних змін фізико-хімічних властивостей ферменту. Це залежить від хімічної природи носія, способу іммобілізації, а також від типу ферментативної реакції.

До носіїв висувають певні вимоги: вони повинні бути нерозчинні в реакційному середовищі, мати протилежний від ферменту заряд, високу гідрофільність, хімічну та біологічну стійкість, міцність, не викликати неспецифічної адсорбції і сильних конформаційних змін молекули білка. Носії для іммобілізації можуть мати зернисту структуру, а також виконуються у вигляді волокон, плівок, порожніх трубок, мембран .

Усі носії для іммобілізації підрозділяються на дві групи: органічні полімерні носії та неорганічні. У якості органічних носіїв широко використовуються як природні (полісахаридні і білкові), так і синтетичні (поліметіленовими, поліамідні і поліефірні) матеріали. Останні отримують шляхом радіаційної полімеризації.

До групи неорганічних носіїв відносять синтетичні кремнеземні сорбенти, метали і їх окису, нержавіючу сталь, різні види глин, кераміки і інші природні матеріали. Вони легко регенеруються, їм можливо надати будь-який вид (порошки,

кульки і ін.), проте мають свої недоліки: підвищену розчинність в лужній середовищі, неспецифічну сорбцію ферментів і високу вартість.

Способи іммобілізації поділяють на дві групи: хімічні і фізикобіологічні. Хімічні методи засновані на утворенні одного або декількох хімічних зв'язків між молекулами ферменту і носія. При цьому останній необхідно попередньо активувати, щоб створити можливість для його взаємодії з певними групами молекули ферменту. В таких групах виступають аміногрупи залишків лізину, тирозину, гистидина, аргініна і цистеїну, а також небілкові компоненти ферментів.

Найбільш поширеним хімічним методом іммобілізації являється ковалентне зшивання з носієм. Для зв'язування білка застосовують різноманітні способи закріплення: ангідридні, азидні, ацилімідазолні, бромціанові, за допомогою хлорпохідних, глутарового альдегіду, шляхом азосполучення, алкілування та ін. Метод ковалентної іммобілізації забезпечує високу міцність комплексу ферменту, але він є дуже складним і часто призводить до суттєвої деформації молекул ферменту і втрати каталітичної активності [28].

Запропоновано способи іммобілізації ліпази шляхом алкілування з полімерним носієм, що містить активований подвійний зв'язок, і носієм, що містить епоксидне кільце. Ковалентний спосіб зв'язування був також використаний для приєднання дріжджовий ліпази *Candida rugosa* за допомогою глутарового альдегіду на скляних намистинках.

Іммобілізація ліпаз дозволила широко використовувати їх в промислових масштабах, так як в звичайному вільному вигляді вони були занадто дорогими. Крім того, в пов'язаному стані вони більше стійкі в середовищі з органічними розчинниками.

Аналіз літератури показує, що серед різних способів іммобілізації добре зарекомендувала себе фізична сорбція. В Японії це самий поширений метод.

Для збільшення ефективності часто проводять попередню модифікацію ферменту або носія, шляхом введення йоногенних груп з допомогою поліоксікіслот, карбоксиметилцелюлози, бурштинової кислоти.

Підвищення активності при адсорбції на поліпропілені ліпаз з *Candida rugosa*, *Mucor miehei*, *Candida cylindracea* досягали шляхом попередньої обробки ферментів поліетиленгліколем, октаноїлхлоридом, глюта-ральдегідом, органічними розчинниками.

Молекули ліпази з *Candida rugosa* були модифіковані різними гідрофобними групами і адсорбовані на гранулах органічних полімерних р'єв. за порівняно з нативною формою, іммобілізована ліпаза характеризується більшою термоустойчивістю в органічних розчинниках [29].

Відомий препарат іммобілізованої ліпази, приготований на подрібненій до порошку кісткової тканини - відходу м'ясопереробної промисловості. істотно підвищувалася термостабільність ферменту. Отриманий біокаталізатор використовувався для безперервного гідролізу оливкової олії в реакторі.

Фізико-хімічні властивості іммобілізованих ліпаз.

Іммобілізація призводить до змін активності, стабільності, специфічності, енергії активації. Часто спостерігається зниження активності в зв'язки з екрануванням активного центру, конформаційними змінами зрушеннями в молекулі та ін. Це залежить не тільки від методу іммобілізації, але і від типу ферментативної реакції .

Іммобілізація ліпаз призводить до їх інактивації, іноді на 90-85% або дуже сильному збільшенні активності - кратність становить від 1,5 до десятків тисяч. Останнє пов'язане, можливо, з виборчим зв'язуванням ліпази при іммобілізації неочищеного препарату.

Оптимум рН для іммобілізованих ліпаз або не змінюється, або зсувається в лужну зону на 0,5-2,0 од. Такий ефект можливий з огляду на установленної серін-залежної нуклеофільної атаки, Підтримуваної залишком гістидина, які виконують функцію основи. Хоча часткове відкриття кришки після іммобілізації ферменту виставляє гістидин активного центра до безпосереднього контакту з іонами водню в розчині, тому тільки менш кисле середовище створює форму кільця гістидина, необхідну для виконання функції основи.

Після іммобілізації ліпаз спостерігається підвищення температурного оптимуму на 2,5-23,0 ° С. Передбачається, що іммобілізація надає білку більше жорстку форму,

так як дію високих температур пов'язують з порушенням властивої ферментам глобулярної структури.

Однак велика перевага іммобілізації ліпаз полягає в їх стабільності у відношенні до високої температури, денатуруючих агентів, екстремальних значень рН, автолізу, мікробного впливу. В деяких випадках вдається збільшити питому активність. Ці ефекти можна пояснити обмеженням її рухливості у зв'язки зі збільшенням жорсткості білкової глобули.

На кінетичні параметри реакції з участю іммобілізованих ферментів в переважній більшості випадків здійснюють вплив як характеристики розчину, прикордонного шару і носія, так і дифузійні властивості продукту і субстрату. Дослідниками відзначається зміни в специфічності дії іммобілізованих ферментів, які проявляють більш спорідненість до низькомолекулярних субстратів.

Іммобілізована на алкіламінових скляних намистинках за допомогою глутарового альдегіду ліпаза *Candida rugosa* мала оптимум дії при температурі 45° С і рН 8,0, величини  $K_m$  і  $V_{max}$ , рівні 88 дм і 615 од/мг білка відповідно. Вона зберігала 100% активність при температурі 45° С протягом 2 годин, а при температурі 4° С в трис-НСІ буфері з рН 8,0 - 60 діб.

Ковалентне зв'язування ліпази *Rhizopus oryzae* на оксиді алюмінію за допомогою глутарового альдегіду призводить до значного зменшенню активності - на 77% від вихідної, при цьому рН оптимум іммобілізованого ферменту був змінений на 1,5-0,7 од в більше лужну сторону порівняно з нативним і дорівнює 8,5, а температурний оптимум - в сторону більше високих температур (50°С). Вступ полівінілового спирту зменшувало величину константи Міхаеліса в 20 раз, прискорюючи процес зв'язування трібутиріна з ферментом за рахунок збільшення поверхні розділу фаз. Час роботи іммобілізованої ліпази при 50° С був 4,5 діб.

Л. Моджовік та інші описали іммобілізацію ліпази з *Candida rugosa* на носії. Вона представляє собою мікропористий метакрилова полімер. При оптимальних умовах максимальна кількість пов'язаного білка становило 15,4 мг /мл з активністю 62% у порівнянні з нативним. Данна ліпаза зберігала 50% своєї активності

після 5 циклів гідролізу.

Ефективність іммобілізації ліпази з *Candida cylindracea* на гідрофобних цеолітах типу Y склала 33%, а кількість максимально пов'язаного білка - 8,2 мг / г носія, енергія активації для процесу адсорбції дорівнювала 43кДж / моль.

Адсорбція лужної ліпази *Pseudomonas aeruginosa* на біоспецифічному адсорбенті впливала на фізикохімічні властивості ферменту. рН оптимум зміщувався в більш лужну зону 7-8, а рН стабільність перебувала в більш вузькому діапазоні що, мабуть, зобумовлено локальним впливом носія. Питома активність іммобілізованого препарату підвищувалася, що пов'язано з його очищенням безпосередньо завдяки специфічності зв'язування. Подібні результати були отримані при адсорбції і ковалентном зв'язуванні цієї ліпази на сорбент з магнітними властивостями. Аналіз кінетичних характеристик досліджуваної ліпази показав збільшення максимальної швидкості реакції для адсорбційно пов'язаного препарату і зменшення - для ковалентно пов'язаного.

*Candida rugosa* зі специфічної активністю 2940 од / мг білка іммобілізованих на різних носіях: полівінілхлориді, хітині, хітозаном, агарозе, сефарозе, трісакріле. При цьому низька гідролітична активність відзначаюча для комплексу ліпаза-хітозан. Більш високою термостабільністю володіє ліпаза, сорбована на полівінілхлориді, ніж пов'язана з агарози. Оптимальні значення рН і температури для іммобілізованого ферменту зсувалися порівняно з нативним від 7,5 до 8,5 і від 35 до 45-55° С. стабільність іммобілізованого препарату при 30° С становила 400 год.

#### **1.4. Практичне використання ліполітичних ферментів**

Ліпази були створені природою для розщеплення складноєфірних зв'язків в триацілгліцерині. Але вони здатні каталізувати і зворотню реакцію в мікроеводних умовах. Ці два основні процесу можуть бути скомбіновані послідовним чином для створення ряду реакцій, об'єднуються терміном переестерифікації. Залежно від вихідних субстратів це може бути алкоголіз, ацидоліз і власне переестерифікація (коли

відбувається обмін карбоновими кислотами між тріацілгліцеріни). При цьому можна використовувати неорганічні і металеві каталізатори. Але реакції проходять при високих температурах і тиску, продукти частково розкладаються, даючи сторонні запахи і нестандартний колір. Тому потрібно не тільки великі енерговитрати, але і додаткова дистиляція готового продукту. Для ліполітичних реакцій необхідна низька енергія активації, тому вони проводяться при помірних температурах і рН.

Промислове використання ліпаз не є новим. З тих пір як Клод Бернард в 1849 році виявив, що панкреатичні ліпази здатні гідролізувати деякі жири, було описано безліч ліпаз з різноманітних джерел, відрізняються по каталітичній активності і специфічності дії. Найбільше потенційне застосування у багатьох галузях промисловості мають позаклітинні мікробні ліпази. До недавнього часу мікробні ліпази були менш доступні порівняно, наприклад, з протеазами і глікозідазами. Це було пов'язано з низьким виходом при ферментуванні і дорожнечою. Успішне застосування іммобілізації і технології рекомбінатна ДНК дозволило отримувати ліпази з високим виходом і необхідними властивостями. Кілька типів ферментних препаратів ліпаз тепер пропонується під різними торговими марками.

Найбільший попит на ферментні препарати має місце на виготовленні детергентів, але тут потрібні ліпази з високою стабільністю в лужних умовах.

В останній час проводяться цілеспрямовані дослідження по при-трансформаційних змін ліпаз в складі миючих засобів, шампунів та зубних паст. Є пропозиції використовувати ліпазу для сухої чистки тканин та виведення плям з одягу.

В шкіряній промисловості мікробні ліпази використовуються для знежирення та пом'якшення шкіри. В виробництві текстилю ферментативна переробка поліефірних волокон ліпазою збільшує їх гідрофільність та, відповідно, підвищує змочуванність та всмоктує здатність тканин. Грибні ліпази є ефективним інструментом біологічного контролю при виробництві паперу. Велику роль мікробні ліпази відіграють в очищенні промислових відходів. Так, ліпази з *Rhizopus microsporia* та *Oosporolactis* можуть застосовуватися для знежирення відходів шовкових виробництва. В комплексі з іншими



мікроорганізмами ліпази входять в склад фільтрів для біологічного очищення стічних вод.

Мікробні ліпази застосовують в хімічному аналізі для кількісного визначення нейтральних ліпідів, тригліцеридів в ліпопротеїдах, а також у структурному дослідженні тригліцеридів.

Наступне промислове застосування ліпаз з перспективним майбутнім - отримання оптично активних речовин. Наприклад, специфічні по відношенню до оксикислот ліпази використовуються для отримання оптично чистих лактонів і естолідів. Естоліди застосовують як мастильні масла, добавки в косметичних препаратах, диспергируючих речовин для принтерних чорнил, а лактони - в парфумерії, для ароматизації їжі, як регулятори зростання рослин або як напівпродукти хімічного синтезу біологічно активних з'єднань.

Широко відомо отримання гліцерину і жирних кислот мікробними ліпазами. При цьому субстратами можуть служити як низькосортні види рослинних олій та тваринних жирів, так і відходи масложирової промисловости. Отримані внаслідок реакцій біоперетворення речовини знаходять широке застосування в фармацевтичній, косметичній та харчової промисловості.

Імобілізовані ліпази *Candida*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Humicola* вискористуються для синтезу ефірів гліцерину та інших спиртів з карбоновими кислотами. Ці речовини необхідні в косметичної та харчової промисловости. З допомогою іммобілізованих ліпаз з *M. miehei*, *C. antarctica*, *Asp. oryzae*, здійснюється синтез терпенових та тіолових ефірів, відомих своїми смаковими і ароматичними властивостями.

Ліполітичні ферменти мають велику цінність для харчових технологій. Керований гідроліз молочного жиру в виробництві сирів необхідний для прискорення їх дозрівання, для створення характерного смаку сиру і масла. В нинішній час з додаванням ліпаз отримують сироподібні продукти і модифіковані сири, як інгредієнтів в приправах, супах. Відомі й інші приклади додатки ліпаз в харчової технології. Їх вводять в склад композицій ферментів, призначених для освітлення соків та вин, а також для поліпшення смакових якостей напоїв. Частковий гідроліз яловичого

жиру в складі харчових продуктів покращує їх властивості та сприяє його швидкому засвоєнню. За даними І. Байчіва ліполітично активні штами дріжджів в складі заквасок у виробництві шинки здійснюють позитивний вплив на формування її смаку і аромату. При виготовленні японського саке попередньо обробляють водним розчином ліпази. В пасті місо дріжджова ліпаза звільняє з соєвого масла жирні кислоти і каталізує утворення їх етилових ефірів, що утворює специфічний смак і аромат місо.

Новим є отримання з допомогою специфічних ліпаз поліненасищених жирних кислот, зосереджених в риб'ячому жирі та мають цінність в лікуванні та профілактиці коронарних хвороб здійснюється як ферментативний гідроліз, так і синтез тригліцеридів з такими кислотами.

Дуже цікавий напрямок використання ліпаз - створення структурованих жирових продуктів. Тут має місце поєднання гідролізу, синтезу, переетерифікації. Це залежить від властивостей вихідних речовин і специфічності ферментів.

Реакції обміну ацильними групами в ефірах можуть каталізуватись сплавом натрій-калій. Ці процедури, широко використовуються в олеохімічній промисловості. При цьому відбувається випадкове переміщення і обмін між різними положеннями в триацилгліцеридах. Тому важко дати оцінку процесу в відношенні кінцевого продукту. Ліпази з певної субстратної та позиційної специфічністю, головним чином є ідеальним інструментом для виробництва нових видів триацилгліцеринів. Однак безліч проблем пов'язано з використанням ліпаз в наведених середовищах. Це нерозчинність ферментів в маслах. Через кінетичні труднощі ліпази взагалі (як правило) показують занижену швидкість при переетерифікації у порівнянні з гідролізом. З комерційної точки зору, для досягнення прийнятних швидкостей ліпаза повинна бути придатна для повторного використання.

Перспективним напрямком хімії та біотехнології жирів та масел є використання біореакторів на основі іммобілізованих ферментів, за допомогою яких можливо здійснювати безперервний процес трансфорції ліпідів.

За допомогою *Candida antarctica* в реакторі безперервної дії здійснювали збагачення жирними кислотами масла з рисових висівок.

Для здійснення гідролізу масел використовують мембранні реактори. Фермент зв'язується з мікропористою гідрофобною мембраною в процесі циркуляції його водного розчину з однією боку, а з іншої сторони мембрани в протилежному напрямку рухається субстрат. Реакція гідролізу протікає в порах мембрани. Таким чином здійснений гідроліз жиру при 50°C є термостабільною ліпазою *Thermomyces lanuginos a*, з метою отримання жирних кислот і гліцерину.

### **1.5. Висновки до розділу**

Однак, незважаючи на настільки великі дослідження мікробних ліпаз залишається багато спірних питань в тлумаченні механізму їх дії, субстратної специфічності. Мало інформації по питанням стабілізації нативних ферментів, фізикохімічним та кінетичним властивостями іммобілізованих препаратів. Ефективність використання ліпаз, перш за все, залежить від активності і селективності їх дії, умов проведення конкретного біотехнологічного процесу. Іммобілізація мікробних ліпаз дозволяє отримати стійкі, стабільні біокатализатори для великомасштабного промислового виробництва. Тому перед дослідниками стоять завдання фундаментального вивчення властивостей, як нативних, так і іммобілізованих ліпаз з метою отримання багатоцільового продукту біотехнології.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Особливості виділення ліпази з *Rhizopus oryzae*

Як продуцента ліпази та об'єкта досліджень використовували мікроскопічний гриб *Rhizopus oryzae (japonicus)* 1403 .

Цей мікроорганізм здатний синтезувати ліпазу з активністю на рівні відомих в нинішній час продуцентів і має перспективи промислового застосування.

Чисту культуру гриба підтримували на середовищі наступного складу, (%): соєве борошно - 2; кукурудзяний екстракт - 0,6; (NH<sub>4</sub>) 2HP04 - 0,4; олеїнова кислота - 0,3; глюкоза - 1; агар - 2. продуцент вирощували при температурі 30 ± 2 ° С в протягом 6-7 добу і потім зберігали при 4 ± 1 ° С.

Для біосинтезу ліпази використовували глибинний спосіб культивування в колбах Ерленмейера об'ємом 500 см<sup>3</sup>, які містять 100 см<sup>3</sup> живильного середовища. При оптимальних умовах: температура 30-32 ° С, тривалість 60 год. поживна среда мала наступний склад (%): соєва макуха - 2,0; кукурудзяний екстракт -0,6; (NH<sub>4</sub>) 2HP04 - 0,4; олеїнова кислота - 0,3; початкове значення рН 7,0. Засіяне середовище виробляло спорову суспензію гриба в кількості 1% про що відповідало 2,5x10<sup>6</sup> "а 100 см<sup>3</sup> середовища.

#### 2.2. Методи визначення ліполітичною активності

##### 2.2.1. Визначення активності ліпази титрометричним методом

Ліполітичну активність культуральної рідини і ферментних препаратів визначали модифікованим методом Yamada Machida.

Як субстрат використовували 0,1 М емульсію субстрату в 2% розчин іполівнілового спирту. Реакційна суміш містила 2,5 см<sup>3</sup> емульсії, 2 см<sup>3</sup> 0,05М фосфат ноцитратного буфера з певним значенням рН і 0,5см культуральної рідини або розчину ферменту. Час інкубації складав 30 хв. Після цього для припинення реакції додавали 15 см<sup>3</sup> суміші етанолацетон (1: 1 об /об) і 10 см<sup>3</sup>0,05 М NaOH. Контрольний дослід здійснювали так само, але титрування проводили відразу після додавання культуральної рідини або розчину ферменту.

За одиницю ферментативної активності ліпази приймали таку кількість ферменту, яка звільняє 1 моль жирної кислоти за 1 хв.

#### 2.2.2. Визначення активності ліпази рН методом

Метод рН [30] використовували в дослідях по визначенню генетичних характеристик гідролітичного розщеплення субстратів під дією нативної і іммобілізованної ліпази.

Сталість концентрації іонів водню в реакційному середовищі підтримували за допомогою приладу для автоматичного титрування.

Реакційну суміш вносили в термостатний осередок з мішалкою, туди ж занурювали електроди від рН метра ТА включали магнітну мішалку. Реакційну суміш нагрівали до 37 ° С, рН доводили 0,1 М NaOH до величини 7,0, після цього доливали 1 см ферментного розчину, включали титратор і підтримували сталість рН дозованої подачею 0,05 М розчину NaOH. Відзчитуваний по бюретці об'єм пішов на титрування за певні пропроміжки часу, і обчислювали швидкість гідролізу в ЦМ жирних кислот за хв.

### 2.3. Методи визначення активності супутніх ферментів

Активність протеази в ферментному препараті ліпази ГЗХ *Rhizopus oryzae* 1403 визначали модифікованим методом Ансона; глюкоамілази глюкозо оксидазним методом.

#### **2.4. Методи кількісного визначення змісту білка**

Зміст білка в ферментному препараті визначали методом Лоурі . На стадіях очищення та знесолення ферментних препаратів використовуючи спектрофотометричний метод кількісного визначення білка. Він заснований на здатності ароматичних амінокислот (триптофану і тирозину) поглинати ультрафіолетове світло з максимумами поглинання при 280 нм та 260 нм . Концентрацію білка  $C$  (мг /см<sup>3</sup>) розраховували за формулою:

$$C = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260}$$

#### **2.5. Отримання препаратів ліпази різної чистоти**

Отриману глибинним способом культуральну рідину продуцента *Rhizopusoryzae* 1403 відділяли від біомаси шляхом вакуум-фільтрування. Концентрування фільтрату культуральної рідини проводили за допомогою ультрафільтрації.

Ультрафільтрацію здійснювали на установці плоскокамерного типу циклічного дії з використанням універсальних ацетатцелюлозних мембран марки УАМ. Вибір мембран виробляли по таким характеристикам як проникність ( $G$ , л / м ч) та селективність ( $R$ ,%), які розраховували по формулами:

$$G = V / (F \cdot T) ,$$

де  $V$ - Об`єм ультрафільтрата, л;  $F$ - площа робочої поверхні, м;  $T$  - тривалість процесу, ч;

$$R = (1 - (A/A'')) ,$$

де  $A$  - активність ліпази в вихідному розчині і в ультрафільтраті.

Вміст сухих речовин в розчинах ферменту визначали на рефрактометрі УРЛ 1.

Осадження ферменту з концентратів культуральної рідини проводять ацетоном або спиртом при температурі суміші 2-4° С. Для формування осаду суміш витримували 15-20 хв, після чого його відділяли на центрифугі при частоті обертання 3000 хв та після дворазового промивання холодним органічним розчинником висушували до сухого стану під вакуумом.

При отриманні препарату ГЗХ та високоочищених препаратів ліпази застосовували вакуумсублімаційн сушку на сушарці періодичної дії KS-30 фірми «Friger»(Чехословаччина).

Високоочищені препарати ліпази отримували методами іоннообмінної гель хроматографії. При цьому осад, отриманий після осадження, розчиняли в мінімальній кількості 0,05 М фосфатного буфера рН 6,5. Нерозчинну частину відділяли центрифугуванням, супернатант наносили на колонку (2,2x60)см SephadexG-150 Superfine( Pharmacia, Швеція), попередньо врівноважену цим буфером. Об'єм фракцій - 3 см. В кожній фракції визначали білкову та ліпазну активність. Фракції активного піку після гел'фільтрації збирали та концентрували з допомогою сухого SephadexG-25 (Pharmacia).

Іонообмінну хроматографію здійснювали на колонці (2,0x15,0) см, заповненій DEAE-52 Cellulose( ватман, Англія), врівноваженою 0,05 М фосфатним буфером, рН 6,5. Елюцію сорбованих білків проводили розчином NaCl в ступеневому градієнті концентрацій 0,1-0,9 М зі швидкістю 30 см / год. Об'єм фракцій - 7 см. Активні фракції кожного піку об'єднували, концентрували та знесолювали.

Знесолення розчинів ферменту здійснювали на колонці (1,5x30,0) см з SephadexG-25, врівноваженим 0,05 М фосфатним буфером, рН 6,5.

## **2.6. Визначення молекулярної маси ліпази**

### 2.6.1. Метод гел'єфільтрації

Визначення проводили на колонці з SephadexG-100 Superfine (Pharmacia, Швеція), в якості використовували білки з відомою молекулярною масою: лізоцим - 14,4 кДа; соєвий інгібітор трипсину - 21,5 кДа; карбоангідраза - 31,0 кДа; овальбумін - 45,0 кДа; сироватковий альбумін - 66,2 кДа; целюлаза - 94,6 кДа.

Для розрахунку молекулярної маси використовували формулу:

$$\lg M = 5,941 - 0,847 V/V_0,$$

де M - молекулярна маса ферменту; V<sub>3</sub>- Об`єм виходу ферменту, см<sup>3</sup>; V<sub>0</sub>- вільний Об`єм колонки, см<sup>3</sup>.

### 2.6.2. Метод електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності SDS

Метод заснований на порівняно електрофоретичній рухливості білків, оброблених додецил сульфатом натрію. Існує досить сувора пропорціональність між значеннями логарифма молекулярної маси білків та їх електрофоретичної рухливості в гелі.

## 2.7. Ізоелектричне фокусування ліпаз

Ізофокусування ліпази проводили на установці фірми «Фармація» методом, описаним Весербергом і Свенсенем, на колонці довжиною 30 см. Для створення градієнта щільності застосовували сахарозу, при цьому використовували рН - амфоліни-носії з межами рН 2,5-4,0 і 4,0-6,0. Температура процесу - 5° С, початкові значення сили струму 10 мА, напруги - 400 В; тривалість - 36 год. Після закінчення поділу білків колонку розвантажували, збираючи фракції по 2 см і визначали в них рН, кількість білка та ліпазну активність.



## 2.8. Визначення амінокислотного складу ліпаз

Амінокислотний склад препаратів досліджуваного ферменту ліпази визначається на автоматичному амінокислотному аналізаторі ААА-339Т МІКРОТЕХНА (Чехословаччина). Метод заснований на окисненні амінокислот мурашиною кислотою в співвідношенні 1: 9 з подальшим гідролізом в 6,0 М НСІ при 110° С в запаяних ампулах протягом 24 год. Для визначення триптофану наважка ферменту (0,5 - 1,0 мг) гідролізували в 1 см<sup>3</sup>. Протягом 24 год в запаяних в вакуумі ампулах. Потім додавали 2 см<sup>3</sup> NaOH, розводили водою до 5 см<sup>3</sup>, фільтрували, сушили ліофільно та проводили аналіз на амінокислотному аналізаторі.

## 2.9. Модифікація ліпази специфічними інгібіторами

При дослідженні функціональних груп ліпази *Rhizopus oryzae* 1403 методами специфічного інгібування розчином ферменту в буфері з концентрацією 50-100 ЦГ /см витримували з реагентами при 20 ± 1° С. Активність ліпази визначали при оптимальних умовах. Фотоокислення ліпази проводили на світлі з використанням лампи, коливання на відстані 10 см в присутності 5ЮМ розчину метиленового синього. Контролем була проба з тією ж концентрацією фотосенсибілізатора, яка витримується в темряві. Концентрація метиленової сині була обрана з таким розрахунком, щоб не відбувалася інактивація ферменту в темряві та щоб був відчутним ефект інактивації при освітленні. Паралельно проводили дослідження по інактивації ферменту на світла в умовах кімнатної температури та відсутності фотосенсибілізатора. Модифікацію діетил пірокарбонатом (DEP) проводили, розраховуючи, щоб в реакційній суміші концентрація спирту становила не більше 1,25% (така концентрація спирту не впливає на активність ферменту) [31]. Модифікацію ферменту фенолметилсульфонілфторидом (PMSF) [32] здійснювали в інтервалі його концентрацій 5-Ю - 1-Ю М.

## 2.10. Методи іммобілізації ліпази

Адсорбцію ферменту здійснювали на неіоногенному сорбенті МЕР 100 (ЦТ) - стіросорбі. Для підготовки сорбенту до роботи з ним його заливали п'ятикратним об'ємом ацетону, витримували до набухання, потім відмивали дистильованою водою до відсутності розчинника по показникам спектрофотометра при довжині хвилі 211 нм.

Досліди по сорбції ліпази проводили в статичних умовах. Для цього сорбент змішували з розчином ліпази в 0,05 М фосфатно-цитратному буфері (рН 6,5) при співвідношенні 1:10. Інкубацію проводили при перемішуванні з плином певного часу та заданої температури. Потім суміш центрифугували при 1000 хв 5 хв.

Іммобілізація ліпази на аніоніті АВ-17-2п. До смоли додавали п'ятикратний об'єм охолодженого до 5° С 1% розчину глутарового альдегіду та залишаються при перемішуванні на 2 години, глутаровий альдегід багаторазово відмивали водою. За допомогою вакуумного насоса розчин ферменту відділяли від носія, осад промивали п'ятикратним об'ємом буфера.

Кількість білка, адсорбованого на носії та ефективність іммобілізації (E,%) були визначені по формулами:

$$B_r = (C_o - V_o - C_f - U_f) \cdot m$$

Де  $C_o$  – вихідний зміст білка, мг /см<sup>3</sup>;  $V_o$ - початковий Об'єм розчину білка, см;  $C_f$  – зміст білка в фільтрат, мг /см;  $U_f$  - Об'єм фільтрата, см<sup>3</sup>;  $m$ - маса полімеру, м.

$$E = [(A_T - V_o - A_f - U_f) / A_T - U_o] \cdot 100,$$

де  $A_o$  - початкова активність ліпази, од /см<sup>3</sup>;  $V_o$ - початковий Об'єм розчину ліпази, см;  $a_f$  - активність ліпази в фільтрате, од /см;  $U_f$  - Об'єм фільтрату, см [19].

## 2.11. Висновки до розділу

Мікроорганізм *Rhizopus oryzae* здатний синтезувати ліпазу з активністю на рівні відомих в нинішній час продуцентів і має перспективи –промислового

застосування. Були досліджені методи визначення активності ліпази різними способами (титрометричним, рН методом, метод гел'фільтрації та інші).

## РОЗДІЛ 3

### ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТІВ ЛІПАЗИ З *RHIZOPUS ORYZAE* 1403. ВИВЧЕННЯ ЇХ ФРАКЦІЙНОГО СКЛАДУ ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ

#### 3.1. Отримання технічних препаратів ліпази

Мета роботи полягала в удосконаленні технології отримання ферментного препарату ліпази *Rhizopus oryzae* 1403 з використанням сучасних методів концентрування та фракціонування.

На першому етапі проводилось концентрування фільтрату культуральної рідини продуцента, для чого використовували ультрафільтрацію. Початкове затримання сухих речовин у фільтраті культуральної рідини (ЯЖ) становило - 1,5 %, білка - 3,6 мг /см, активність ліпази - 40,5 од /см, питома активність -11,55 од /мг білка. В якості субстрату використовували оливкову олію.

Ультрафільтрацію культуральної рідини продуцента здійснювали на установці плоскокамерного типу циклічної дії при температурі  $20 \pm 1^\circ \text{C}$  з використанням ацетатцелюлозних мембран марки УАМ. Ацетатцелюлозні мембрани широко використовуються для ультрафільтрації ферментів. При ультрафільтрації ліпази з *Penicillium sp.* процес здійснювали в два етапи. На першому звільнили розчин ліпази від високомолекулярної речовин, за допомогою ацетил целюлозних мембран з розміром пір 220 нм. На другому використовували ті ж мембрани з розміром пір 50-100 нм, а також мембрани вінілового ряду, для концентрування розчину ліпази, та одночасного видалення низькомолекулярних білків. Ступінь концентрування досягла 1,2-1,3 рази.

Підбір мембрани був проведений за такими специфічними ознаками, як проникність ( $G$ , л / м-ч) і селективність ( $R$ ,%), характеризуючим швидкість процесу і ступінь затримування концентрованих речовини. Мембрани значно розрізнялися між собою по водопроникності – від 0,28 - 10 до 1,9 - 10, що впливало не тільки на проникну здатність, але й на селективність по відношенню до вивчення ферменту (табл. 3.1). Чимало важливу роль грав розмір пір мембран - їх збільшення призводило до підвищення швидкості ультрафільтрації та зниження ступеня затримування ферменту.

Таблиця 3.1

Підбір ацетатцелюлозних мембран по фізико-хімічним характеристикам для ультрафільтрації розчину ліпази

Марка мембрани	Технічна характеристика мембран		Проникність мембра	Селективність, R%
	Діаметр пір	Проникність по воді л /м <sup>2</sup> - ЧХ Ю <sup>2</sup> при 20°С та 0,15 МП		
AM - 30	0,0 ± 1,0	0,28-0,29	0,8-0,9	94-96
AM - 50	0,0 ± 2,5	0,43-0,45	1,4-1,5	75-77
AM-100	00,0 ± 5,0	1,70-1,80	2,0-2,1	30-35

Максимальну селективність 94-96% і мінімальну проникність 0,8-0,9 л / м-ч мала мембрана УАМ-30, що мабуть пов'язано з молекулярної масою досліджуваного

ферменту.

Результати ультрафільтрації фільтрату культуральної речовини представлені в табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Результати ультрафільтрації фільтрату культуральної рідини *Rhizopus oryzae* 1403 на мембрані УАМ-30

Найменування зразка	Об'єм, см <sup>3</sup>	Вміст сухих речовин, %	Загальна ЛАхЮ \ од	Вихід фермента по активності	В і Загальне утримання білка, мг %	З а Питома активність, од / мг білка
Фільтрат ЯЖ	2000	1,5	81,0 ± 2,43	100	7000 ± 210	1,25 ± 0,30
Ацетат целюлозна мембрана	1400	0,5	1,1 ± 0,05	1,3	2500 ± 75	,44 ± 0,08
Концентрат	600	3,8	79,2 ± 2,22	97,8	3950 ± 100	0,15 ± 0,61

В основному фермент утримувався мембраною, але незначна активність була виявлена і в фільтраті - втрати її склали 1,3%.

Таким чином, проведені дослідження показали, що для ультрафільтрації фільтрату культуральної рідини може бути використана ацетат целюлозна мембрана

УАМ-30.

При допомозі ультрафільтрації вдалося сконцентрувати розчин ферменту в 2,5 рази по СВ, відбувалося його часткове очищення. Втрати при ультраконцентруванні були мінімальними та становили 1,5 та 2,0%. Попередньо сконцентрований ферментний розчин піддавали вакуум сублімації при сушінні.

Процес заморожування - невід'ємна частина технології вакуумсублімаційного зневоднення, тому представляло інтерес дослідження впливу низьких температур на специфічну активність.

При заморожуванні ферменти поведуть себе по-різному, зберігаючи або втрачаючи свою активність, що залежить від природи білка [34]. Для вибору раціональних режимів охолодження було вивчено вплив швидкості і температури заморожування на активність досліджуваної ліпази. Встановлено, що при зниженні температури від 0 до мінус 5° С активність ферменту не скільки не знижується, а в інтервалі мінус 15-20 ° С збільшується на 15-35% по порівняно з вихідної.

Це співпадає з даними інших дослідників, згідно з якими при температурі мінус 2-10° С, як правило, ферменти менш стійкі. Для пояснення такого явища ближче підходить гіпотеза про зміни міжмолекулярних взаємодій [35], так як культуральна рідина представляє собою суміш різноманітних речовин. Подальше зниження температури від мінус 20° С викликає падіння активності, що може бути пов'язано з явищем дегідратації білкової молекули, внаслідок виморожування води.

Гідратаційний шар води, структурно пов'язаний з білковою молекулою, має велике значення для формування її нативної конформації і виконання білком специфічних функцій.

Швидкість заморожування також впливала на активність препарату. Дуже повільне охолодження (0,01°С/с) було менш сприятливим. Втрати ліполітичної активності на стадії сублімації сушки склали 5 – 1%. Результати досліджень представлені в табл. 3.3.

Наступним етапом роботи було отримання ферментного препарату з фільтрату культуральної рідини шляхом осадження органічним розчинником. Осадження проводили

спиртом в співвідношенні 1: 2 об /про при рН 5,5, або ацетоном 1:3 (табл. 3.4). При підкисленні частина білків випадала в осад і, незважаючи на втрати активності (7-9%), його видаляли, так як його присутність помітно зменшувало розчинність готового препарату в цілому. Питома активність ферменту збільшувалася на стадії підкислення в 1,08-1,10 раз. Осадження ферменту ацетоном в співвідношенні 1:1 дозволило отримати препарати з меншим вмістом баластних речовин - питома активність його зросла в 10 раз у порівнянні з вихідної, вихід ліпази склав - 35,0%. Залучений таким чином препарат використовувався на стадіях очищення.

Таблиця 3.3

Характеристика етапів отримання препарату ліпази Г20Х

Стадії очищення	Об`єм (см <sup>3</sup> )	Ліполітична активність		Вихід,%	Ступінь очищення
		Вихідна, од/см або од / г	Питома, од /мг		
Вихідна культуральна рідина	2000	40,6 ± 1,1	11,6 ± 0,35	100	-
Фільтрація культуральної рідини	1900	39,7 ± 0,95	12,54 ± 0,38	92,9	1,05
Концентрування ультрафільтрацією	410	180,5 ± 5,4	20,3 ± 0,60	91,1	1,75
Сублімаційна сушка ультраконцентрата (ліпаза Г20Х)	28	2424 ± 73,5	19,7 ± 0,59	83,6	1,70
Розпилювальна сушка ультраконцентрат (ліпаза Г20Х)	17	3855 ± 63,2	18,46 ± 0,55	80,7	1,59

Наступним етапом роботи було отримання ферментного препарату з фільтрату культуральної рідини шляхом осадження органічним розчинником. Осадження проводили спиртом в співвідношенні 1: 2 об /про при рН 5,5, або ацетоном 1:3 (табл. 3.4). При підкисленні частина білків випадала в осад і, незважаючи на втрати активності (7-9%), його видаляли, так як його присутність помітно зменшувало розчинність готового препарату в цілому. Питома активність ферменту збільшувалася на стадії підкислення в 1,08-1,10 раз. Осадження ферменту ацетоном в співвідношенні 1:1 дозволило отримати препарати з меншим вмістом баластних речовин - питома активність його зростає в 10 раз у порівнянні з вихідної, вихід ліпази склав - 35,0%. Залучений таким чином препарат використовувався на стадіях очищення.

Таблиця 3.4

Характеристика етапів отримання препарату ліпази ГЮХ

Стадії очищення	Об`єм (см <sup>3</sup> ) або	Ліполітична активність од /см <sup>3</sup> або од /г	Вихід, %	Ступінь очищення	
Вихідна культуральна рідина	2000	40,6 ± 1,1	11,6 ± 0,35	0	-
Фільтрація культуральної рідини	1900	39,7 ± 0,95	12,2 ± 0,38	2,9	1,05
Підкислення до рН 5,5 фільтрату культуральної рідини	394	172,6 ± 5,4	13,9 ± 0,66	3,8	1,20
Осадження етанолом фільтрату	6,95	2746 ± 82	15,8 ± 1,1	3,5	1,36
Осадження ацетоном фільтрату	11,4	3647 ± 165	24,3 ± 1.1	1,2	2,09



Результати досліджень, проведені в роботі по концентруванню і осадження розчинів ліпази дозволили розробити схему отримання препаратів ГЗХ, ГЮХ і Г20Х. Препарат ліпази, отриманий шляхом висушування фільтрату культуральної рідини, містив незначні домішки інших ферментів. Було виявлено присутність ліпоксигенази (50 од/г); протеази (7,5 од/г); целюлази - 5 (од/г); амілазна і глюкоамілазна активності не були виявлені. Експертиза цього препарату встановила, що він не володів токсичною дією при дозах в десятки тисяч раз перевищуючих рекомендовані для його промислового використання. Слід звернути увагу на те, що для застосування в технології їжі рекомендований більше очищений препарат ліпази- ГЮХ, а також те, що процеси приготування проходять без безпосереднього додавання фермента, тому їх можна, можливо вважати безпечними.

### **3.2. Отримання високоочищених ферментних препаратів ліпази**

Раніше проведені дослідження по очищенні ліпази *Rhizopus oryzae* 1403 показали наявність однією фракції ферменту; до гомогенного стану фермент не був очищений. У зв'язку з цим була прийнята інша схема очищення [36].

Ферментний препарат, отриманий в наслідок ультрафільтрації та поступового осадження, піддавали гел'фільтрації на SephadexG-150. Для елюції був застосований ступінчастий градієнт концентрації NaCl від 0,1 до 0,9 М, так як в ряді випадків він опинявся більше ефективним, ніж лінійний [37]. Крім того, в буфер був доданий Тритон Х-100, так як десорбція деяких ліпаз проходить краще в присутності детергентів [38].

Таким чином, нами було встановлено наявність двох ізоформ ферменту. При цьому кратність очищення склала 74,7 і 58,00 с виходом по активності 8,38 і 14,15% для І і ІІ фракції відповідала (табл. 3.5). Далі вони були названі як ліпаза І та ліпаза ІІ.

Продуктори ліпаз - *Rh. oryzae*, *Rh. microsporus*, *Penicillium sp*, також мають множинність форм.

Молекулярну масу фракцій ліпази визначали методами гельфільтрації та електрофорезу в присутності SDS з використанням білків з відомою молекулярною масою. Певна гельфільтрація на Sephadex G 150 молекулярна маса ліпаз I та II перебувала в межах 40-45 кДа. Дослідження молекулярної маси методом електрофорезу в присутності SDS показали, що вона практично була однаковою у двох ізоферментів і дорівнювала  $44 \pm 2$  кДа.

Таблиця 3.5

Характеристика етапів очищення ліпази *Rhizopus oryzae* 1403

Етапи	Кількість білка, мг	Ліпазна активність		Вихід, %	
		Питома, од /мг	Загальна	По активності	По білку
Фільтрат культуральної рідини	$1784,0 \pm 53,5$	$11,8 \pm 0,4$	$21,01 \pm 0,6$	10	100
Ультрафільтрація на мембрані УАМ-30	$822,6 \pm 24,6$	$21,2 \pm 0,6$	$17,44 \pm 0,5$	82,7	46,1
Осадження ацетоном (1:1)	$50,9 \pm 1,5$	$21,4 \pm 3,6$	$6,19 \pm 0,2$	29,5	3,4
Гель-фільтрація G-150	$33,4 \pm 1,0$	$65,0 \pm 4,9$	$5,50 \pm 0,2$	26,2	1,9
Хроматографія на ДЕАЕ-52	I	$2,0 \pm 0,06$	$880,2 \pm 26,4$	$1,76 \pm 0,05$	8,4
Хроматографія	II	$3,6 \pm 0,10$	$83,2 \pm 20,4$	$2,47 \pm 0,07$	14,2

Ізоелектричні дослідження ізоформ ліпази *Rh. Oryzae* 1403 показують, що рі ліпази I дорівнює 3,0, а ліпази II 4,2. За даними літератури рі більшості ліпаз мікробного походження знаходяться в кислої зоні: *Rh. microsporus*-3,6, *Rhizomucor miehei*- 3,8; *Rh. oryzae-A,1C*; *P. candidum*-5,5; *Mucorhiemalis*- 4,6.

Отже, внаслідок очищення ліпази *Rhizopus oryzae* 1403 встановлено, на відмінність двох препаративних форм, які були отримані в гомогенному вигляді. Вони володіли однаковою молекулярною масою -  $44 \pm 2$  кДа. Питома активність складала 880,2 і 683,2 од /мг білка для ліпази I і ліпази II відповідно. Активність ліпаз мікробного походження коливається в широких спектрах. Для ліпази *Rhizomucor miehei* вона складає 1080 од /мг; *Fusarium sp.* -434 од /мг; для ліпази I5000, ліпази II- *Rh. niveus*-7200 од /мг.

### 3.3. Фізико хімічні властивості ізоферментів ліпази I та ліпази

## II

#### 3.3.1. Дослідження амінокислотного складу ліпаз

Сьогодні існує досить велика база даних по амінокислотному складу різних ліпаз, котрий визначений за допомогою хімічних досліджень, або по сиквенсу до ДНК. Амінокислотний склад ліпази I та ліпази II представлений в табл. 3.6.

Таблиця 3.6.

Амінокислотний склад (%) ліпаз *Rhizopus oryzae* 1403

Амінокислота	<i>Rhizopus oryzae</i> 1403		<i>Rhizomucor miehei</i>
	Ліпаза I	Ліпаза II	
Ala	6,19	6,60	5,43
Cys	1,13	1,63	1,91
Asx	10,56	9,43	10,78
Glx	9,78	7,99	8,94
Phe	7,61	7,36	5,22
Gly	4,91	5,38	3,89
His	2,11	2,25	2,10
He	6,53	7,17	6,21
Lys	2,92	3,38	3,30
Leu	7,23	7,85	8,88
Met	1,75	1,15	1,68
Pro	4,98	7,74	6,23

Arg	3,43	4,56	5,27
Ser	9,52	8,14	9,01
Thr	8,86	9,10	8,86
Val	8,21	6,52	8,52
Tyr	3,38	2,66	7,36

У обох ізоферментів виявлено низький зміст неполярних амінокислот - 47,62 та 45,62%. Подібні дані повідомлені для ліпази *Rh.delemar* і *Humico lalanuginosa* [39], *Mucor hiemalis*, *Candida parapsilosis*. У зазначеної загальної тенденції на перший погляд є протиріччя, які виражені полярністю ферменту і гідрофобністю субстратів. Однак передбачається, що афіність ліпаз до поверхні розділу пов'язана з їх третинною структурою білка, яка надає ферменту амфіпатичні властивості, подібно до детергенті в. У ліпаз *Rh. microspores* кількість неполярних залишків більше полярних в 1,3-1,6 раз; для панкреатичних ліпаз свині і щури воно практично однакові. Ліпази *Rh. oryzae* 1403 III розрізняються співвідношенням амінокислот з позитивно і негативно зарядженими радикалами. Ставлення (Glx+ Asx) До (Lys+ Arg) для ліпази I становили 3,23, ліпази II- 2,27. Між ізоформами спостерігається велика відповідність в амінокислотному складі, за винятком Asx, Pro, Glx, Arg, Ser і Val. Склад амінокислот спостерігається іноді не тільки між ізоферментами, але і видами, належать до одному класу грибів. Висока схожість (близько 50%) у ліпаз *Rh. oryzae* 403 спостерігається з ліпазою *Rhizomucor miehei*.

### 3.3.2. Вплив рН і температури на активність ізоферментів

Ферменти ліпаз часто відрізняються не тільки молекулярною масою, ізоелектричними точками, але і фізико-хімічними характеристиками каталіза, специфічністю і структурою [40]. Проведені експерименти по впливу рН на активність двох форм ліпази *Rh. Oryzae* 1403 показали, що вони відрізняються рН оптимумами: для ліпази I - це рН 6,5, а для ліпази II - 6,0. Активність ліпази I зберігається досить високою в інтервалі рН 5,0-7,0; для ліпази II цей інтервал вже -

5,5-6,5. При рН 5,0 втрати активності у першій ізоформи зіставили 28%, у другій - 45%, а при відхиленні в лужну зону - рН 7,0 - 20 і 49% відповідно.

За оптимальної температури дії ліпази I та II не розрізнялися - це 35° С. Ліпаза II більш чутлива до підвищеної температури. При 40° С її активність падала на 28%, в той час як у ліпази I вона знижувалася на 18%. Подальше підвищення температури до 45° С викликало різке зменшення гідролітичної активності обох ізоформ на 55%.

За цим фізико-хімічні властивості ліпази *Rh. Oryzae* 1403 близькі до ізоформ амліпаз *Rh. Niveus* [41]. Практично всі ліпази грибів мають оптимум рН 6,0-7,7 [42]. Температурний діапазон знаходиться в межах 25-45° С.

### 3.4. Висновки до розділу

Була розроблена технологія отримання препаратів ліпази мікроміцетів *Rhizopus oryzae* 1403 різного ступеня чистоти на основі ультрафільтрації, осадження органічними розчинниками та сублімації сушки.

Методами гельфільтрації та іонообмінною хроматографією встановлено наявність двох ізоформ ферменту, позначених як ліпаза I та ліпаза II з питомої активністю 880,2 та 683,2 од /мг білка відповідно. Молекулярна маса ізоферментів була однаковою -  $44 \pm 2$  кДа. Вони відрізнялися значеннями  $pI$  і рН оптимумом. Оптимальна температура для обох форм склала 35° С.

## ВИСНОВКИ

1. Проаналізовано технологію отримання препаратів ліпази мікроміцетів *Rhizopus oryzae* 1403 на основі ультрафільтрації, осадження органічними розчинами, вакуумсублімації сушки. Активність препаратів склала 2424 та 2746-3647 од/г відповідно.

2. Методами гел'фільтрації та іоннообмінної хроматографії встановлено на відмінність двох ізоформ ферменту, позначених як ліпаза I та ліпаза II. Питома активність ліпази I склала 880,2; ліпази II- 683,2 од /мг білка. Ферменти відрізнялись рi: 1-3,0, H-4,2; рН оптимумом - 6,5 і 6,0. Оптимальна температура дії для обох ізоформ -  $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Молекулярна маса була однаковою -  $(44 \pm 2)$  кДа.

3. Значення рК іонізації ліпази I - 5,2 і 6,9 дозволяють допустити участь в її каталітичному дії залишків гістидину та карбоксильної групи.

4. Наявність гістидину в активному центрі ліпази I доведено значеннями рК та теплоти іонізації ( $29,1$  кДж -моль<sup>-1</sup>), інактивацією фотоокислення і зниженням  $V_{\text{max}}$  при інгібуванні діетилпірокарбонатом.

5. Ліпаза I проявляє селективність до жирних кислот із середньою довжиною ланцюга (C12-C18), що містить не більше 2 подвійних зв'язків і володіє специфічністю до 1 і 3 положення в тригліцеридах.

6. Встановлено оптимальні умови іммобілізації ацетаноосажденної ліпази за допомогою адсорбції на стирсорбі і зв'язування з аніонітом АВ-17-2п. Ефективність

імобілізації склала 67,5 і 23,0% відповідно; час напіввиведення препаратів при безперервній роботі лабораторного реактора 18 і 96 годин відповідно.

7. Обґрунтовано позитивний ефект впливу масла, підданого ферментативному гідролізу ліпазою *Rhizopus oryzae* 1403.

## СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sanched A. Enantioselective esterification of 2-arylpropionic acids and trans-2-phenyl-1-cyclohexanol: Comparison between immobilised lipases from *Candida rugosa* and *Rhizomucor miehei* I / A. Sanched, F. Valero, J. Lafuente. – New York: Basic Books, 1998. – 1145 p.

2. Давронов К. Д. Мікробні ліпази в біотехнології / К. Д. Давронов. – Москва: Айрис-пресс, 1994. – 534 с.

3. Pabai F. Use of continuous culture of screen for lipase producing mikroorganismus and interestrification of puffer fat by lipase isolates / F. Pabai, S. Kermasha, A. Morin. – San Diego: Academic Press, 1996. – 452 p.

4. Richardson I. S. The anatomy and taxonomy of protein structure / Richardson. – New York: Bantam Books, 1981. – 239 p.

5. Sanched A. Characterization of the lipase and esterase multiple forms in an enzyme preparation from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation / A. Sanched, P. Ferrer, A. Serrano. – Oakville: Apple Academic Press, 1999. – 214 p.

6. Hesugi V. Humeda Continual conocrsion of the fatty acid in rice bran oil to triacylglyceril by immobilizea lipase / V. Hesugi, T. Humeda, N. Azuma. – MenloPark: John Benjamins, 1997. – 448 p.

7. Алмаши А. Очистка, сини физико-получения химические и уровне каталитические положения свойства иммобилизацию микробных интерес липаз / А. Алмаши, Л. Эрдели, Т. Шарой. – Москва: Ассоциация XXI век, 1979. – 408 с.

8. Березин И. В. Имобилизованные ферменты / И. В. Березин, Н. В. Клячко, А. В. Левашов. – Москва: Баллас, 1987. – 159 с.
9. Myung-Heez K. Kim / К. Myung-Heez, К. Hyung-Kwoun, L. Jung-Kee. – Mahwah: Erbaum, 2000. – 286 p.
10. Oaster D. Mutant of *Geotrichum candidum* which produces novel enzyme system to selectively hydrolyse triglycerides / D. Oaster, A. Hall. – New York: Free press, 1997. – 291 p.
11. Ари Р. Ю. Очищение, физикохимического и каталитические свойства микробных липаз / Р. Ю. Ари, Б. Я. Лусине. – Латвия: Вентана-Граф, 1979. – 106 с.
12. Левчук Т. П. Ліполітичні ферменти / Т. П. Левчук. – Харків: Світ, 1978. – 396 с.
13. Мартьянов В. А. Получение высокоактивных перпаратов нейтральной протеазы *Bacillus subtilis* / В. А. Мартьянов, А. Ф. Зябрев. – Рязань: Элевар, 1989. – 225 с.
14. Сапунова Л. И. Отримання пектінгідролазного ферментного препарату з *Aspergillus alliaceus* / Л. И. Сапунова, Р. В. Михайлова. – Санкт-Петербург: Вита Пресс, 1989. – 174 с.
15. Benjamin S. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation / Benjamin. – Toronto: Guilfort, 2002. – 69 p.
16. Яровенко В. В. Концентрування ферментних розчинів методом ультрафільтрації / В. В. Яровенко. – Харків: Дрофа, 1978. – 79 с.
17. Дужак А. Б. Виділення і властивості препаратів позаклітинних ліпаз природного (В-10) і мутантного (М-1) штамів / А. Б. Дужак, З. Н. Панфілов, Є. А. Васюнін. – Херсон: Наука, 2000. – 411 с.
18. Tamio M. Purification and characterization of *Penicillium roqueforti* IAM7268 lipase / M. Tamio, M. Yuko, M. Akura. – Pekin: SPI, 1995. – 330 p.
19. Дубцова Г. Н. Липид-белковые комплексы пшеницы, их определение и роль в технологических процессах. / Г.Н. Дубцова. – Москва: МТИПП, 1999. – 650 с.



20. Ковальская Л. П. Технология пищевых продуктов / Л. П. Ковальская, И. С. Шуб, Г. М. Мельник. – Новосибирск: Кроус, 1999. – 114 с.
21. Лурье И. С. Технохимический контроль сырья в кондитерском производстве. / И. С. Лурье. – Санкт-Петербург: Каро, 1987. – 271 с.
22. Панфилова З. И. Ферментный препарат липаза и штамм бактерий *Serratia marcescens* В-10 L-1 / З. И. Панфилова, А. Б. Дужак, Р. И. Санганик. – Новосибирск: СО РАН, 1997. – 80 с.
23. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов / И. М. Грачева, А. Ю. Кривова. – Москва: МЦНМО, 2000. – 512 с.
24. Выделение и характеристика внеклеточных липаз микромицета *Penicillium* sp. / К. Д. Давронов, К. А. Тумялова, Б. Розмухамедова, М. Шамилева. – Москва: Агар, 1994. – 237 с.
25. Harwood J. The versatility of lipases for industrial uses / Harwood. – Berlin: Pantheon, 1989. – 126 p.
26. Некоторые свойства внеклеточной липазы *Rhizopus microsporus* УзЛТ-3 / К. Д. Давронов, И. Т. Куйлибаев, Б. Х. Розмухамедова, А. А. Махсумханов. – Обнинск: Титул, 1995. – 405 с.
27. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа / В. А. Яковлев. – Санкт Петербург: Наука, 1965. – 248 с.
28. Николаенко С. В. Повышение эффективности сублимационной сушки ферментных препаратов / С. В. Николаенко. – Воронеж: ВТИ, 2000. – 64 с.
29. Basri M. Stability of hydrophobic lipase derivatives immobilized in organic polymer beads / M. Basri, K. Ampon. – Lublin: Libertas Academica, 1994. – 183p.
30. Петрова Л. Л. Застосування рН статного методу для вивчення ферментної дії ліпази *Penicillium* sp. / Л. Л. Петрова, Г. А. Казаніна, А. А. Селезньова. – Кривий Ріг, 1977. – 758 с.
31. Мусил Я. А. Современная биохимия в схемах / Я. А. Мусил, О. Н. Новакова, К. В. Кунц. – Москва: Мир, 1984. – 264 с.

32. Рахимов М. М. Изучение липолитических ферментов и некоторых закономерностей гетерогенного ферментативного катализа / М. М. Рахимов. – Ташкент: Гид, 1981. – 580 с.
33. Шеламова Н. А. Оптимизация условий биосинтеза / Н. А. Шеламова, С. А. Жеребцов. – Волгоград: Учитель, 1984. – 109 с.
34. Каулянец К. А. Микробные ферменты препаратов: технология и оборудование / К. А. Каулянец, Л. И. Голгер. – Томск: Федоров, 1979. – 304 с.
35. Пушкарь Н. С. Кріопшкодження ферментів і ферментних систем. Актуальні проблеми кріобіології / Н. С. Пушкарь, А. М. Білоус. – Київ: Наукова думка, 1981. – 607 с.
36. Штыркова Е. А. Технология и технологический контроль крахмального производства / Е. А. Штыркова. – Челябинск: Школьная пресса, 1986. – 315 с.
37. Rugani D. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit / D. Rugani, N. Druet. – Chicago: Springfield, 1995. – 962 p.
38. Снегирева И. И. Современные методы исследования качества пищевых продуктов / И. И. Снегирева, Ю. Н. Жванко. – Тула: Лотос, 1976. – 222 с.
39. Derewenda L. Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar* / L. Derewenda, R. Swenson. – Granger: Techno Science, 1994. – 52 p.
40. Рухлядева А. П. Методы определения активности гидролитических ферментов / А. П. Рухлядева, Г. В. Польшалина. – Москва: Промышленность, 1981. – 288 с.
41. Safari M. Characterization of purified lipase fractions from *Rhizopus niveus* / M. Safari, B. Bisakowski. – Ottawa: Publisher House, 1988. – 421 p.
42. Шеламов С. А. Биосинтез и физикохимические свойства липаз *Rhizopus japonicus* / С. А. Шеламов. – Воронеж: ОТИ, 1984. – 20 с.