

Введение В настоящее время специализированные жиры занимают значительный объем масложировой отрасли как рецептурные ингредиенты для молочной, кондитерской, хлебопекарной промышленности [1,2]. Для получения специальных видов жиров и гидролиза жирового сырья широкое применение находят липолитические ферменты. Липаза (гидролаза триглицеридов, К.Ф.З.1.1.3) - фермент, катализирующий гидролиз триглицеридов до глицерина и жирных кислот. Высокая специфичность липолитических ферментов к строению жирно-кислотного остатка и его положению в молекулах триацилглицеридов дает возможность получать широкий спектр жировых продуктов.

Липолитические ферменты также находят широкое применение в самых различных отраслях, пищевой промышленности, в медицине, в бытовой химии, в биохимии. Липазы могут быть выделены из растений, животных, а также из природных и рекомбинантных микроорганизмов. Получение липазы из микроорганизмов имеет ряд преимуществ по сравнению с получением из сырья растительного и животного происхождения [3]. Активные продуценты липаз принадлежат к различным группам микроорганизмов: это бактерии родов - *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* и *Thermoactinomyces*; дрожжи (в основном, представители рода *Candida* - *C.rugosa*, *C. lipolytica*, *C.antarctica*). Однако в пищевой промышленности самое активное применение находят ферменты мицелиальных грибов родов - *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Humicola*, *Geotrichum*. В последнее время все чаще используются рекомбинантные штаммы, позволяющие получать высокий уровень липаз с заданными свойствами [4]. Диморфные аскомицетные дрожжи *Yarrowia lipolytica* являются перспективным объектом для получения промышленно ценной липазы. Кроме того, дрожжи *Yarrowia lipolytica* характеризуются большей устойчивостью к высоким концентрациям субстрата, чем грибы и большей толерантностью к ионам металлов, что позволяет использовать менее очищенные субстраты [5]. Состав питательной среды оказывает большое влияние на уровень биосинтеза липаз микроорганизмами. Микробные липазы являются индуцируемыми ферментами. Индукторами обычно являются субстраты, на которые действует данный фермент или продукты их гидролиза, а также некоторые аналоги этих соединений. Действие индукторов зависит от вида и штамма микроорганизма и от природы самого индуктора [6-8]. Целью данного исследования было изучение влияния источника углерода и природы индуктора на рост и липолитическую активность дрожжей *Yarrowia lipolytica*. Объекты и методы исследования Для исследования липолитической активности использовались микроорганизмы *Yarrowia (Candida) lipolytica*. Данный штамм был получен из Всероссийской Коллекции Промышленных микроорганизмов. Регистрационный номер в коллекции Y-3153 (ATCC 34088). Липолитическую активность определяли в культуральной жидкости в динамике через 12, 18, 24, 36, 48 ч культивирования по модифицированному методу Ота и Ямада. При определении липолитической

активности в качестве субстрата использовали 40% эмульсию оливкового масла в 3% растворе желатина. В субстрат в количестве 2,5 мл вносили 2,0 мл фосфатно-цитратного буфера (pH 7.4). Полученную смесь выдерживали при температуре 37 °С в течение 10 мин. Затем в смесь вводили 1 мл культуральной жидкости и хорошо перемешивали. Смесь выдерживали при температуре 37 °С в течение 60 мин, после чего немедленно вносили 15 мл этилового спирта для прекращения реакции. Раствор титровали 0,05 н водным раствором NaOH в присутствии 1 % раствора фенолфталеина до появления устойчивой розовой окраски. Контроль не содержал фермента. Ферментный раствор вносили в контрольную пробу непосредственно перед титрованием. Активность липазы выражали в микромолях олеиновой кислоты, освобождающейся за 1 ч при гидролизе субстрата одним миллилитром культуральной жидкости. Для получения посевного материала использовали сусло-агар. Посевной материал выращивали в течение 24 часов, суспендировали в физ.растворе и вносили в жидкие питательные среды в количестве 10 % от объема. Культуру выращивали на качалке в колбах объемом 100 мл с 15 мл среды со скоростью вращения 250 об/мин при 30 °С. В качестве жидкой среды при культивировании дрожжей использовали среды следующего состава: · липидный (жировой) компонент - концентрация данного компонента варьировалась от 0 до 2%; · глюкоза - концентрация изменялась в диапазоне 0-20 г/л; · дрожжевой экстракт - 5 мл/л; · пептон - 10 г/л. В качестве жирового компонента использовали оливковое, касторовое, льняное и сливочное масло. По окончании инкубации содержимое колб тщательно перемешивали, биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин.). В надосадочной жидкости (осветленной культуральной жидкости) определяли содержание белка биуретовым методом и липолитическую активность модифицированным методом Ота-Ямада. Отделенную биомассу дважды промывали дистиллированной водой и высушивали до постоянной массы. Обсуждение результатов На первом этапе было рассмотрено влияние концентрации глюкозы и времени культивирования на параметры роста и липолитической активности культуры *Yarrowia lipolytica* при использовании традиционных сред, без добавления липидных индукторов. Использовались среды, содержащие различные концентрации глюкозы (0-20 г/л), пептон в концентрации 10 г/л, как основной источник белка и дрожжевой экстракт в концентрации 5 г/л, как основной источник сложных органических соединений. Результаты этих исследований приведены на рисунке 1. Рис. 1 - Зависимость липолитической активности культуры от концентрации глюкозы в среде и времени культивирования: 20 г/л (■), 10 г/л (●), 5 г/л (▲), 0 г/л (○). Состав питательной среды: глюкоза - 0-20 г/л, дрожжевой экстракт - 5 мл/л, пептон - 10 г/л Максимальный прирост биомассы и высокая липолитическая активность наблюдаются при концентрации глюкозы в среде 20 г/л. Однако, если

концентрация биомассы возрастает с увеличением времени культивирования, то липолитическая активность в ходе культивирования снижается, причем наиболее значительно при использовании более низких концентраций глюкозы 5 и 10 г/л приблизительно в 5 раз (см. рис 1). При биосинтезе липаз в качестве индукторов микроорганизмы используют природные жиры растительного или животного происхождения, а также некоторые ПАВы. В качестве индукторов синтеза липазы дрожжами *Yarrowia lipolytica*, нами были изучены следующие виды масел - оливковое, льняное, касторовое и сливочное. Выбор этих масел был обусловлен их различным жирно - кислотным составом. Используемые в работе оливковое и касторовое масла содержат преимущественно один ацильный остаток, соответственно, олеиновой и рицинолевой кислоты, льняное масло характеризуется высоким содержанием полиненасыщенных  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 жирных кислот, а сливочное масло - повышенным содержанием насыщенных кислот, в том числе и низкомолекулярных [9-10]. Влияние выбранных индукторов биосинтеза липазы исследовалось при использовании питательных сред с различным содержанием глюкозы от 0 до 20 г/л. В таблице 1 приведены результаты этих исследований при концентрации глюкозы 20 г/л и различном времени культивирования. Анализ полученных результатов показывает, что на ранних этапах культивирования (время инкубации - 18 часов) все используемые индукторы тормозят рост липолитической активности. На втором этапе (через 24 часов культивирования) заработали два индуктора - касторовое и сливочное масла, липолитическая активность при использовании этих индукторов возросла почти в два раза. Эти же индукторы увеличивали продукцию липазы и через 48 часов культивирования. Касторовое масло почти в три раза, а сливочное масло около двух раз. Наибольший прирост биомассы на всех этапах наблюдается при использовании льняного масла в качестве индуктора. Это можно объяснить тем, что пищевое льняное масло, которое не подвергается рафинированию, обладает наибольшей биологической ценностью из используемых жиров, т.к. содержит большое количество  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 полиненасыщенных жирных кислот, витаминов, микроэлементов и других биологически активных веществ, что и приводит к ростостимулирующему эффекту. Однако хороший рост дрожжей при использовании льняного масла не сопровождался увеличением продукции фермента. Напротив, на всех этапах культивирования наблюдалось значительное снижение липолитической активности по сравнению с контролем. Вероятно, это можно объяснить тем, что легкогидролизуемое льняное масло, и продукты его гидролиза являются компонентами, интенсивно используемыми клеткой для роста и построения клеток. Аналогичный эффект только чуть менее выраженный, наблюдается и для оливкового масла. Таблица 1 - Влияние вида индуктора на рост и липолитическую активность культуры *Yarrowia lipolytica*. Состав питательной среды: глюкоза 20 г/л, пептон 10 г/л и дрожжевой экстракт 5 г/л. Концентрация индуктора 1% об. Вид индуктора ЛА, Ед/мл к.ж. Б, мг/мл к.ж.

АСБ, г/л УЛА, Ед/мг белка ОЛА, Ед/г АСБ

Время культивирования – 18 часов

Контроль\* 65 6,05 4,79 10,79 13,63 Оливковое масло 53 6,12 6,41 8,71 8,31

Льняное масло 18 5,68 8,06 3,22 2,27 Касторовое масло 32 6,27 4,48 5,05 7,13

Сливочное масло 85 6,05 9,20 14,05 9,24

Время культивирования – 24 часов

Контроль 47 5,16 8,05 9,04 5,80 Оливковое масло 43 6,34 9,89 6,86 4,38

Льняное масло 17 6,04 10,62 2,75 1,58 Касторовое масло 83 6,48 6,79 12,88 12,26

Сливочное масло 95 5,46 9,40 17,45 10,11

Время культивирования – 48 часов

Контроль 43 5,46 7,64 7,94 5,67 Оливковое масло 12 8,11 11,85 1,44 0,98

Льняное масло 7 7,44 11,65 0,90 0,58 Касторовое масло 118 7,07 7,00 16,75 16,90

Сливочное масло 78 6,70 9,05 11,69 8,66 \*без индуктора

ЛА – липолитическая активность, Ед/мл к.ж. Б – концентрация белка в культуральной жидкости, мг/мл к.ж. АСБ – абсолютно сухая биомасса дрожжей, г/л УЛА – удельная липолитическая активность, Ед/мг белка культуральной жидкости ОЛА – относительная липолитическая активность дрожжей, приходящаяся на грамм биомассы, Ед/г АСБ

Совершенно противоположенный эффект наблюдается при использовании в качестве индуктора касторового масла. Это масло не является пищевым продуктом, не содержит ростостимулирующих компонентов, но обладает бактерицидными свойствами и высокой вязкостью. Поэтому введение касторового масла в среду культивирования приводит к ингибированию роста биомассы за счет токсического эффекта и ухудшению снабжения культуры кислородом. Культура испытывает стресс и пытается избавиться от этого компонента, отвечая повышенной продукцией липазы. Сливочное масло занимает промежуточное положение, увеличивая липолитическую активность, но незначительно стимулируя рост биомассы. Вероятно, это связано с наличием в его составе низкомолекулярных жирных кислот (C4-C12), ацильные остатки которых труднее отщепляются липазой и в меньшей степени используются для построения компонентов клетки. Трудность отделения этих ацильных остатков и приводит к повышению продукции липазы. Через 48 часов культивирования ферментативная активность начинается снижаться, вероятно, за счет исчерпания гидролиза ацилглицеридов, содержащих низкомолекулярные ацильные остатки. Исследовалось влияние вышеназванных индукторов при меньших концентрациях глюкозы в питательных средах 5 и 10 г/л (табл.2 и рис.2)

Таблица 2 - Влияние вида индуктора на рост и липолитическую активность культуры *Yarrowia lipolytica*. Состав питательной среды: глюкоза 10 г/л, пептон 10 г/л и дрожжевой экстракт 5 г/л

Вид индуктора ЛА, Ед/мл к.ж. Б, мг/мл к.ж. АСБ, г/л УЛА, Ед/мг белка ОЛА, Ед/г АСБ

Время культивирования – 18 часов

Контроль 62 6,34 4,92 9,74 12,58 Оливковое масло 48 6,56 6,25 7,37 7,73

Льняное масло 42 6,71 7,11 6,21 5,88 Касторовое масло 53 6,49 4,60 8,22 11,60

Сливочное масло 90 5,94 6,75 15,08 13,35

Время культивирования – 24 часов

Контроль 32 5,68 5,70 5,57 5,55 Оливковое масло 53 7,00 8,42 7,63 6,35

Льняное масло 57 6,85 8,50 8,26 6,67 Касторовое масло 73 6,63 5,91 11,06 12,42

Сливочное

масло 108 5,97 7,00 18,12 15,50  
 5,46 5,73 2,42 2,31 Оливковое масло 35 7,15 10,39 4,90 3,37  
 7,89 10,84 4,87 3,53 Льняное масло 38  
 5,90 7,55 5,07 3,98 Касторовое масло 42 5,60 5,47 7,43 7,61  
 Сливочное масло 30

Анализ данных табл.2 показывает, что на всех этапах культивирования все индукторы, кроме касторового масла, способствуют росту культуры. Однако липолитическая активность снижается на начальном этапе культивирования (18 часов) при использовании всех индукторов, кроме сливочного масла. Максимальный рост липолитической активности при использовании всех индукторов наблюдается через 24 часа культивирования, причем наибольший рост обеспечивают, так же, как и в экспериментах с концентрацией в питательной среде глюкозы 20 г/л, касторовое и сливочное масло (в 2-3 раза). Через 48 часов культивирования, хотя все индукторы обеспечивают липолитическую активность выше, чем в контроле, однако по абсолютным величинам она ниже, чем через 24 часа культивирования. Таким образом, при высоких концентрациях глюкозы в питательной среде (20 и 10 г/л) оптимальное продолжительность культивирования для повышения липолитической активности составляет 24 часа, причем снижение концентрации глюкозы до 10 г/л приводит к повышению липолитической активности.

Несколько иные результаты были получены при использовании индукторов в питательных средах с низким содержанием глюкозы (5 г/л), табл. 3. и рис. 2. а б

Рис. 2. - Влияние вида индуктора на рост (а) и липолитическую активность (б) культуры *Yarrowia lipolytica* Y 3153. Состав питательной среды: глюкоза 5 г/л, пептон 10 г/л и дрожжевой экстракт 5 г/л. Индукторы - сливочное масло (■), оливковое масло(●), льняное масло(▲), касторовое масло (○), контроль (□)

Скудость питательной среды приводит к тому, что уже к 18 часам культивирования все индукторы стимулируют биосинтез липазы. Очевидно, глюкоза исчерпана и культура быстро начинает использовать масла в качестве источника углерода для утилизации которых и нужна липаза. Через 24, 48 часов культивирования оливковое и льняное масла, как наиболее пригодные источники питания вследствие своего жирно-кислотного состава, легкости гидролиза и наличия биологических активных веществ, дают максимальные приросты липолитической активности, почти в 8 раз выше контроля (см. табл.3, рис.2).

Таблица 3 - Влияние вида индуктора на рост и липолитическую активность культуры *Yarrowia lipolytica*. Состав питательной среды: глюкоза 5 г/л, пептон 10 г/л и дрожжевой экстракт 5 г/л, индуктор 1% об

Вид индуктора	ЛА, Ед/мл к.ж.	Б, мг/мл к.ж.	АСБ, г/л	УЛА, Ед/мг белка	ОЛА, Ед/г АСБ	Время культивирования - 12 часов
Контроль	57	6,56	2,98	8,64	19,03	
Оливковое масло	17	6,41	5,43	2,59	3,10	
Льняное масло	17	6,49	6,39	2,57	2,67	
Касторовое масло	47	6,78	3,35	6,88	13,95	
Сливочное масло	23	6,05	4,03	3,86	5,86	
Время культивирования - 18 часов						
Контроль	42	6,56	3,36	6,35	12,42	
Оливковое масло	78	7,22	5,88	10,84	13,31	
Льняное масло	60	7,88	6,85	7,55	8,77	
Касторовое масло	55					

7,00 4,59 7,85 12,05 Сливочное масло 63 5,90 5,28 10,74 12,01 Контроль 42 6,56 3,36 6,35 12,42 Время культивирования – 24 часов Контроль 15 4,21 3,79 3,57 3,96 Оливковое масло 75 6,34 6,96 11,82 10,81 Льняное масло 62 5,24 6,70 11,77 9,22 Касторовое масло 43 4,73 4,66 9,17 9,29 Сливочное масло 38 4,28 4,85 8,95 7,91 Время культивирования – 36 часов Контроль 17 4,65 3,71 3,57 4,48 Оливковое масло 80 6,41 7,75 12,47 10,32 Льняное масло 80 5,83 8,02 13,72 9,95 Касторовое масло 45 4,58 4,25 9,81 10,56 Сливочное масло 17 4,87 5,20 3,41 3,20 Время культивирования – 48 часов Контроль 13 5,09 3,43 2,61 3,87 Оливковое масло 102 5,68 7,64 17,89 13,33 Льняное масло 103 5,61 7,07 18,39 14,58 Касторовое масло 37 4,58 3,53 8,04 10,40 Сливочное масло 17 4,51 4,74 3,69 3,51

Этот вывод подтверждается экспериментами с выращиванием культуры в питательных средах с отсутствием глюкозы. Результаты исследований показывают, что культура *Yarrowia lipolytica* может использовать в качестве источника углерода растительные масла. Наилучшие результаты по липолитической активности получены при использовании в качестве источников углерода и энергии льняного и оливкового масел, хотя эти показатели значительно ниже тех, которые были получены в средах с добавлением глюкозы. Большое влияние на биосинтез липазы оказывает не только вид индуктора, но и его концентрация в среде культивирования. Установлено, что для роста культуры *Yarrowia lipolytica* и биосинтеза ею липазы оптимальным является содержание в питательной среде (5 г/л глюкозы, 10 г/л пептон, 5 г/л дрожжевой экстракт) оливкового масла в концентрации 1 %. Данные представлены на рисунке 3. Рис. 3 – Влияние концентрации оливкового масла (индуктора) на липолитическую активность дрожжей. Время культивирования - 24 часа (■), 48 часов (●) Как видно из представленных данных, оптимальной концентрацией оливкового масла является концентрация 1 % об, именно эта концентрация обеспечивает наибольший прирост липолитической активности. Высокие концентрации масел в среде, вероятно, ухудшают снабжение культуры кислородом, что и приводит к снижению липолитической активности. Таким образом, изучено влияние источника углерода и липидных индукторов на липолитическую активность дрожжей *Yarrowia lipolytica* и получены следующие результаты. При снижении концентрации глюкозы в питательной среде с 20 до 5 г/л, эффективность липидных индукторов возрастает. При концентрации глюкозы в питательной среде 20 и 10 г/л максимальное увеличение липолитической активности под действием используемых липидных индукторов наблюдается после 24 часов, а при концентрации глюкозы 5 г/л после 48 часов культивирования. Все используемые липидные компоненты, кроме касторового масла, являются не только индукторами, увеличивающими продукцию липазы, но и используются культурой для роста. Установлено, что высокая липолитическая активность и хороший рост культуры наблюдаются при выращивании культуры на среде содержащей глюкозу в концентрации 5 г/л и оливковое или льняное масло в

концентрации 1 % об.