

УДК 576.311.34

А. М. Гончаров, В. Г. Гаврилюк, О. В. Мацелюх, А. І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара

**ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА БІОСИНТЕЗ
ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТНИХ КОМПЛЕКСІВ
*YARROWIA LIPOLYTICA***

Встановлено, що на продукцію протеолітичних ферментів дріжджоподібними грибами впливають джерела вуглецю, нітрогену та енергії. Вивчено вплив різних органічних сполук на протео-, фібрино-, желатино- та гемоглобінолітичну активність ферментів *Yarrowia lipolytica* 2061. Показано позитивний вплив унесення галактози та желатину з гліцином до культурального середовища. Встановлено оптимальну температуру, рН та інші параметри культивування для отримання ферментних комплексів.

А. М. Гончаров, В. Г. Гаврилюк, Е. В. Мацелюх, А. И. Винников

Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
НА БИОСИНТЕЗ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ
ФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ *YARROWIA LIPOLYTICA***

Установлено, что на продукцию протеолитических ферментов дрожжеобразными грибами оказывают влияние источники углерода, азота и энергии. Изучено влияние различных органических соединений на протео-, фибрино-, желатино- и гемоглобинолитическую активность ферментов *Yarrowia lipolytica* 2061. Показано позитивное влияние внесения галактозы и желатина с глицином в культуральную среду. Установлены оптимальные температура, рН и другие физические параметры культивирования для получения ферментных комплексов.

А. М. Goncharov, V. G. Gavriljuk, E. V. Matseljukh, A. I. Vinnikov

Oles' Gonchar Dnipropetrovsk National University

**CULURAL PARAMETERS EFFECT
OF BIOSYNTHESIS OF PROTEOLYTIC ENZYME COMPLEXES
FROM *YARROWIA LIPOLYTICA***

It was established, that production of proteolytic enzymes from yeasts is effected by sources of Carbon, Nitrogen and energy. The impact of different organic substances to proteo-, fibrino-, gelatine- and haemoglobinolytic enzyme activity from *Yarrowia lipoytica* 2061 is established. Positive effect of addition galactose and gelatin with glycine in cultural liquid is revealed. Optimal temperature, pH and other physical parameters for getting proteolitic enzyme complexes is defined.

Вступ

Нині у багатьох галузях господарства застосовуються технології, пов'язані з перетворенням складних органічних речовин на прості гідролітичним шляхом. У зв'язку з цим перспективне застосування гідролітичних ферментів, які продукуються мікро-

організмами. Але для їх широкого промислового застосування необхідне детальне дослідження процесів синтезу та механізмів дії. Особливо важлива оптимізація умов культивування продуцентів із метою отримання максимального виходу кінцевого продукту за мінімальних затрат. Один із перспективних продуцентів протеолітичних ферментів – дріжджоподібні гриби роду *Yarrowia* [5; 8; 13]. Вони добре вивчені у фізіологічному та генетичному аспектах, не вибагливі до умов існування. Для них розроблені схеми селекційного пошуку, а головне – вони продукують велику кількість протеолітичних ферментів, які можна легко виділити та очистити для подальшого практичного застосування [1; 3]. Мета даної роботи – оцінити вплив складу живильного середовища та умов культивування на приріст біомаси та синтез протеолітичних ферментних комплексів штаму *Y. lipolytica* 2061.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт досліджень – штам *Y. lipolytica* 2061 – продуцент протеолітичних ферментів. Для вирощування накопичувальної культури використовували живильне середовище для дріжджів такого складу (г/л): глюкоза – 20,00, сечовина – 1,00, дріжджовий автолізат – 0,30, KH_2PO_4 – 0,50, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,25, KCl – 0,30; $pH = 6,0$.

Для дослідження впливу концентрації джерел вуглецю та енергії на продукцію протеолітичних комплексів штаму *Y. lipolytica* 2061 висівали на живильне середовище зі змінними концентраціями глюкози та галактози (1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 та 30 г/л). Культуру вирощували при інтенсивному перемішуванні протягом 48 годин. У культуральній рідині визначали вміст білка за Лоурі [2; 6; 12], загальну протеолітичну активність – за Ансоном та фібринолітичну активність [3; 5; 11]. Статистичну обробку експериментальних даних проводили з використанням критерію Стьюдента (t) на 5 % рівні значимості. На рисунках і в таблицях наводяться середні дані з визначень.

Результати та їх обговорення

Для вибору оптимального джерела вуглецю та енергії, яке забезпечить максимальну продукцію ферментів, проведено аналіз впливу концентрації глюкози та галактози на приріст білка, протеолітичну та фібринолітичну активність. Зі збільшенням концентрації глюкози зростає вміст білка до 0,486 мг/мл, а ферментативна активність досягає максимуму при концентрації глюкози 20 г/л. При більших її концентраціях синтез ферментів зменшується з $4 \cdot 10^{-2}$ до $4 \cdot 10^{-3}$ од./мл, із чого можна зробити припущення про катаболітну репресію синтезу ферментів глюкозою (табл. 1). Щодо впливу концентрації глюкози на ферментативну активність культуральної рідини, то вона також пригнічується при вмісті глюкози понад 20 г/л. При нижчих концентраціях відмінність за рівнем активності незначна ($0,015 \pm 0,005$ од./мл).

Альтернативне джерело вуглецю та енергії – галактоза, тому для неї також проведено дослідження впливу концентрації на біосинтетичну активність (табл. 2). При концентраціях галактози понад 20 г/л також відбувається зменшення протеолітичної активності. Фібринолітична активність не пригнічується при вищій концентрації галактози (на відміну від глюкози) і залишається на рівні $0,25 \pm 0,05$ од./мл. Це можна пояснити тим, що глюкоза частіше за інші вуглеводи викликає катаболітну репресію синтезу ферментів [6; 7; 9]. Таким чином, загальний вміст білка зростає при підвищенні концентрації обох вуглеводів. Протеолітична активність пригнічується як глюкозою, так і галактозою при їх концентраціях понад 20 г/л; фібринолітична – лише відповідними концентраціями глюкози.

Таблиця 1

**Вплив змінних концентрацій глюкози на ферментативну активність
протеолітичних комплексів *Yarrowia lipolytica* 2061**

Концентрація глюкози, г/л	Вміст білка, мг/мл	Протеолітична активність		Фібринолітична активність	
		од./мл середовища	од./мг білка	од./мл середовища	од./мг
1	0,215 ± 0,0010	0,012 ± 0,0006	0,055 ± 0,0027	0,001 ± 0,0000	0,005 ± 0,0003
2	0,210 ± 0,0010	0,015 ± 0,0007	0,070 ± 0,0035	0,002 ± 0,0001	0,010 ± 0,0005
5	0,260 ± 0,0013	0,018 ± 0,0009	0,070 ± 0,0035	0,003 ± 0,0002	0,014 ± 0,0007
10	0,245 ± 0,0012	0,022 ± 0,0011	0,089 ± 0,0044	0,007 ± 0,0004	0,027 ± 0,0013
15	0,238 ± 0,0012	0,016 ± 0,0008	0,069 ± 0,0035	0,006 ± 0,0003	0,024 ± 0,0012
20	0,331 ± 0,0016	0,013 ± 0,0006	0,040 ± 0,0020	0,005 ± 0,0002	0,014 ± 0,0007
25	0,371 ± 0,0018	0,006 ± 0,0003	0,015 ± 0,0007	0,012 ± 0,0006	0,031 ± 0,0015
30	0,486 ± 0,0019	0,002 ± 0,0001	0,004 ± 0,0002	0,002 ± 0,0001	0,003 ± 0,0002

Таблиця 2

**Вплив концентрації галактози на ферментативну активність
протеолітичних комплексів *Yarrowia lipolytica* 2061**

Концентрація галактози, г/л	Вміст білка, мг/мл	Протеолітична активність		Фібринолітична активність	
		од./мл середовища	од./мг білка	од./мл середовища	од./мг білка
1	0,125 ± 0,0062	0,016 ± 0,0008	0,130 ± 0,0065	0	0
2	0,120 ± 0,0060	0,024 ± 0,0012	0,204 ± 0,0102	0,003 ± 0,00015	0,025 ± 0,0012
5	0,125 ± 0,0062	0,042 ± 0,0021	0,343 ± 0,0171	0,003 ± 0,00015	0,026 ± 0,0013
10	0,145 ± 0,0072	0,040 ± 0,0020	0,281 ± 0,0141	0,004 ± 0,00020	0,027 ± 0,0014
15	0,103 ± 0,0051	0,036 ± 0,0018	0,357 ± 0,0179	0,003 ± 0,00015	0,032 ± 0,0016
20	0,215 ± 0,0107	0,040 ± 0,0020	0,190 ± 0,0095	0,003 ± 0,00015	0,017 ± 0,0008
25	0,215 ± 0,0107	0,002 ± 0,0001	0,009 ± 0,0005	0,004 ± 0,00020	0,018 ± 0,0009
30	0,198 ± 0,0099	0,002 ± 0,0001	0,010 ± 0,0005	0,004 ± 0,00020	0,020 ± 0,0010

На наступному етапі проводили дослідження впливу джерел нітрогену на рівень продукції протеолітичних ферментних комплексів. Додавання до живильного середовища *Y. lipolytica* 2061 неорганічних джерел нітрогену не впливало на рівень протеолітичної активності. Використання як єдиного джерела нітрогену пептону або гліцину з желатином призводило до збільшення загальної протеолітичної активності продуцента на 87, 122 та 156 % відповідно, порівняно з контролем, який містив сечовину як єдине джерело нітрогену (рис. 1). Використання комбінацій желатину з неорганічними сполуками не викликало підвищення активності порівняно із застосуванням желатину. Але комбінація пептону та гліцину з желатином дає можливість збільшити протеолітичну активність культуральної рідини на 196 і 222 % відповідно. Таким чином, для синтезу протеолітичного комплексу *Y. lipolytica* 2061 оптимальне джерело нітрогену у живильному середовищі – суміш гліцину з желатином [9].

Оптимальний склад живильного середовища для забезпечення максимального біосинтезу позаклітинного протеолітичного комплексу *Y. lipolytica* 2061 такий (г/л): желатин – 10,0, гліцин – 1,00, галактоза – 20,00, дріжджовий автолізат – 0,30, KH_2PO_4 – 0,50, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,25, KCl – 0,30. Завдяки оптимізації джерел нітрогену живильного середовища вдалося підвищити активність протеолітичних комплексів *Y. lipolytica* 2061 у 2,4 раза. Для визначення впливу речовин білкової природи на синтез протеолітичних комплексів вивчено дію різних індукторів: гемоглобін, казеїн, желатин, бичачої крові (рис. 2).

При вирощуванні *Y. lipolytica* 2061 на середовищі з додаванням казеїну відбувалася активація синтезу протеолітичного комплексу, при цьому в 2,5 раза порівняно з контролем зростала загальна протеолітична та гемоглобінолітична ак-

тивність. Рівень гемоглолітичної активності на середовищах із бичачою кров'ю та желатином в 1,6–1,8 раза вищий, ніж у контролі. Під час культивування *Y. lipolytica* 2061 на середовищах із казеїном і желатином вдавалося досягти високих показників питомої фібринолітичної активності (0,15–0,16 од./мг), що майже удвічі вище порівняно з контролем.

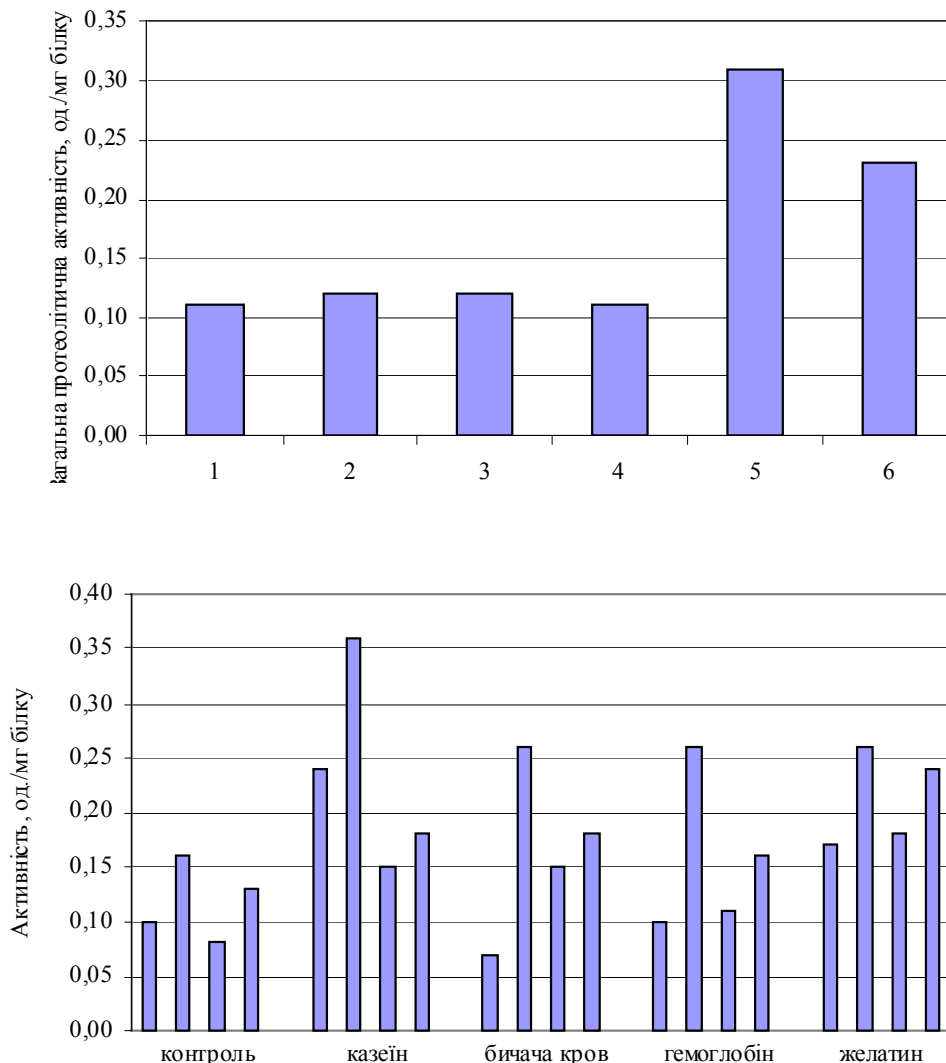


Рис. 2. Вплив речовин білкової природи на продукцію протеолітичних ферментів:
 1 – протеолітична, 2 – гемоглолітична, 3 – фібринолітична, 4 – желатиназна активність

На активність протеолітичних ферментних комплексів, окрім складу середовища, впливають також умови культивування продуцентів: *pH*, температура, об'єм живильного середовища та кількість посівного матеріалу. Вивчення впливу різних факторів дозволить керувати процесами, що протікають у клітині мікроорганізму. Для подальшого підвищення активності досліджено вплив різних умов ферментації на біосинтез протеолітичних ферментних комплексів [5]. Збільшення об'єму живильного середовища та викликане цим зниження швидкості розчинення кисню викликає збільшення активності всіх ферментів. Показано, що культивування продуцента в об'ємі середовища 150–200 мл оптимальне для синтезу ферментів.

Дослідження ефективності перемішування та впливу температури показало, що максимальна активність культуральної рідини *Y. lipolytica 2061* спостерігається під час культивування в умовах качалки при 220 об./хв. Тому підбір температурного режиму проводився саме при такій швидкості перемішування. Виявлено, що в діапазоні температур +28...+30 °C відмічався максимальний рівень активності протеаз штаму *Y. lipolytica 2061*.

Висновки

Встановлено оптимальні умови культивування *Y. lipolytica 2061*, за яких активність протеолітичного комплексу найвища: pH 6,0, температура +28...+30 °C, об'єм живильного середовища 150 мл, об'єм посівного матеріалу 20 мл, джерело вуглецю – галактоза, джерело нітрогену – желатин із гліцином.

Бібліографічні посилання

1. **Влияние** координационных соединений германия на активность ряда гликозидаз / Л. Д. Варбанец, О. Н. Рзаева, Е. В. Мишак и др. // Микробиол. журн. – 2007. – Т. 69, № 3. – С. 11–18.
2. **Долгих М. С.** Протеолитическая активность дрожжеподобных грибов рода *Candida* – продуцентов белка / М. С. Долгих, Э. Г. Кравцов, А. В. Ермолаев // Микология и фитопатология. – 1990. – Т. 24, № 3. – С. 229–235.
3. **Петрова И. С.** Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения / И. С. Петрова, М. Н. Винцонойте // Прикл. биохимия и микробиология. – 1966. – Т. 2, № 1. – С. 322–327.
4. **Польгалина Г. В.** Определение активности ферментов / Г. В. Польгалина, В. С. Чередниченко, Л. В. Римарева. – М.: ДеЛиПринт, 2003. – 250 с.
5. **Andrews P.** Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration // Biochem. J. – 1964. – Vol. 91, N 2. – P. 222–232.
6. **Balaraman K.** Production and purification of fibrinolytic enzyme (trombinase) from *Yarrowia lipolytica* / K. Balaraman, G. Prabakaran // Indian J. Med. Res. – 2007. – Vol. 126, N 5. – P. 459–464.
7. **Barett A. J.** Proteolytic enzymes: aspartic and metalloproteases // Meth. Enzymol. – 1995. – Vol. 248. – P. 183–197.
8. **Genetic control** of extracellular protease synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica* / C. I. Gonzalez-Lopez, R. Szabo, S. Blanchin-Rolanda, C. Gaillardina // Genetics. – 2002. – Vol. 160. – P. 417–427.
9. **Growth and proteolytic activity** of hairy roots from *Yarrowia lipolytica*: effect of nitrogen and sucrose / P. M. L. Lourenço, S. de Castro, T. M. Martins et al. // Enzyme and Microbial Technology. – 2002. – Vol. 31, N 3. – P. 242–249.
10. **pH-regulated expression** of the acid and alkaline extracellular proteases of *Yarrowia lipolytica* / D. J. Glover, R. K. McEven, C. R. Thomas, T. W. Young // Microbiology. – 1997. – Vol. 143. – P. 3045–3054.
11. **The intracellular proteolytic system** of *Yarrowia lipolytica* and characterization of an aminopeptidase / Z. Hernández-Montañez, J. Araujo-Osorio, Y. Noriega-Reyes et al. // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – Vol. 268, N 2. – P. 178–186.
12. **Protein measurement** with the folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, N 1. – P. 265–275.
13. **Protein expression and secretion** in the yeast *Yarrowia lipolytica* / J. M. Nicaud, C. Madzak, P. van den Broek et al. // FEMS Yeast Res. – 2002. – Vol. 2, N 3. – P. 371–379.

Надійшла до редакції 05.06.2010