



ИНДУКЦИЯ БИОСИНТЕЗА ЛИПАЗ МИКРОМИЦЕТОМ *RHIZOPUS ORYZAE* 1403

С.А. Шеламова¹,

Ю.А. Тырсин²

¹ Воронежский государственный университет инженерных технологий, Россия, 394017, г. Воронеж, пр. Революции, 19
E-mail: shelam@mail.ru

² Московский государственный университет пищевых производств, Россия, 125080, г. Москва, Волоколамское шоссе,
11

Биосинтез липазы *Rh. oryzae* 1403 индуцируется триацилглицеролами, жирными кислотами и их производными – твинами. Самый высокий эффект дали оливковое масло, твин 80 и олеиновая кислота. Этот продуцент способен синтезировать два липолитических фермента. Молекулярная масса была одинаковой у двух изоферментов и равнялась 44±2 кДа. Между изоформами наблюдалось большое соответствие в аминокислотном составе.

Ключевые слова: липаза, *Rhizopus*, биосинтез.

Введение

Синтез липолитических ферментов микроорганизмами, за некоторыми исключениями [1], является индуцибельным. Для каждого продуцента необходим выбор индуктора [2–5]. Эффективность индукции, кроме того, зависит от состава питательной среды [6]. По данным многих исследователей биосинтез липазы стимулируют жиры, масла, жирные кислоты и их полиоксиэтиленовые эфиры на основе сорбита – твины [1, 7–11]. Есть данные по добавлению твинов в среды как отдельного компонента, так и вместе с маслами (в качестве поверхностно-активных веществ). В первом случае увеличение активности составляет от 2.5 до 6 раз [12, 13]; во втором – на 25% [14].

Для некоторых продуцентов липаз установлено наличие нескольких изоформ этого фермента [15–18]. Они отличаются структурой, молекулярной массой, каталитическими свойствами, стабильностью. Количество работ, посвященных связи между условиями культивирования штаммов-продуцентов липаз и профилем изоферментов, ограничено. Однако это имеет очень большое значение для надежности оценки свойств неочищенных препаратов одного и того же продуцента, так как они могут содержать различное соотношение изоформ.

Объекты и методы исследования

Продуцент получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов. Набор калибровочных белков «Amercham» (США), твины Sigma Chemical Co (США), реагенты для электрофореза «Sigma» (США); масла: оливковое «Aceites Borges Pont» (Испания), подсолнечное и хлопковое «ЭФКО», льняное «Эколен», горчичное «Родос ТД», касторовое «Тульская фармацевтическая фабрика» (Россия); другие реагенты отечественного производства марки х.ч.

Выращивание продуцента проводили глубинным способом на лабораторной качалке (скорость вращения 1.7–1.8 с⁻¹) в колбах Эрленмейера объемом 500 см³, содержащих 100 см³ питательной среды; 72 ч при температуре 30°C и pH 7.0.

Для выявления множественности форм липазы препараты, полученные из фильтрата культуральной жидкости осаждением ацетоном в соотношении 1 : 2.5 об./об., подвергали электрофорезу в ПААГ в градиенте концентраций геля 5–20%. Полосы с липазной активностью обнаруживали по цветной реакции [19].

Определение молекулярной массы липаз проводили методами гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-100 Superfine (Pharmacia, Швеция) [20] и электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS [19].

Аминокислотный состав липаз определяли на автоматическом аминокислотном анализаторе ААА–339Т МИКРОТЕХНА (Чехословакия).

Гидролитическую активность липазы определяли модифицированным методом Yamada и Machida [21]. Субстрат – оливковое масло. За единицу активности липазы принимали такое количество фермента, которое освобождает 1 μмоль жирной кислоты за 1 мин.

Результаты и их обсуждение

Индукция биосинтеза липазы *Rh. oryzae* 1403 исследовалась в присутствии твинов (они были взяты в качестве источников жирных кислот, которые являются твердыми при температуре 30°C); растительных масел, жирных кислот. Исследования проводились на

среде с пептоном (3%) и солями (%): $(NH_4)_2HPO_4$ – 0.5; $MgSO_4$ – 0.05; $FeSO_4$ – 0.01; KH_2PO_4 – 0.1. Из представленных результатов видно (табл. 1 и рис. 1), что биосинтез липазы *Rh. oryzae* 1403 индуцируется как субстратами – триацилглицеролами, так и продуктами их гидролиза – жирными кислотами и их производными – твинами.

Таблица 1
Влияние жирных кислот и твинов
на биосинтез липазы *Rh. oryzae* 1403

Компонент	Массовая доля, %	ЛА, ед./см ³	ЛА, %
Среда без индуктора	–	12.0	100
Олеиновая кислота	0.5	41.8	350
Линолевая кислота	0.5	27.8	230
Твин 20	1.0	33.6	280
Твин 40	1.0	43.7	360
Твин 60	1.0	39.3	330
Твин 80	1.0	47.4	395

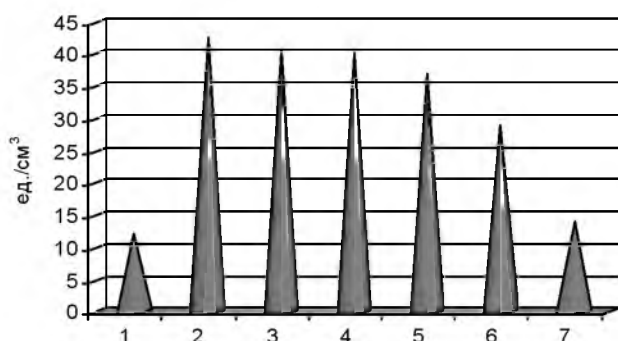


Рис. 1. Липазная активность при культивировании *Rhizopus oryzae* 1403 на пептонно-солевой среде (1) и с добавлением масел (0.5%): оливкового (2); горчичного (3); подсолнечного (4); хлопкового (5); льняного (6); касторового (7)

Активность увеличивалась в 2.3–4.0 раза. Самый высокий эффект дали оливковое масло, твин 80 и олеиновая кислота. По всей вероятности, химическая структура жирной кислоты имеет значение: по мере возрастания длины углеводородной цепи от 12 : 0 (Твин 20) до 18:0 (Твин 80) индукция усиливалась. Полиненасыщенные жирные кислоты и оксикислоты на этом фоне выделялись меньшим положительным влиянием: льняное масло давало увеличение активности по сравнению с пептонно-солевой средой в 2.7 раза, а касторовое – в 1.4 раза. На среде с соевой мукой наблюдалось даже уменьшение активности в присутствии касторового масла. Глицерин на биосинтез липазы стимулирующего действия не оказывал.

На биосинтез липаз микроорганизмами могут оказывать влияние поверхностно-активные вещества. Однако эти сведения весьма противоречивы [3, 4, 12, 22]. Даже у одного и того же продуцента – *Acinetobacter calcoaceticus* ПАВ из одной – полиэтоксилатной – группы вызывали повышение активности до 15 раз или полное подавление роста. Имеет значение концентрация: в присутствии твина 80 при 0.008% активность увеличивалась в 2.5 раза, а при 1% снижалась более чем на 50%

[13]. При культивировании *Pseudomonas sp.*, штамма 109 добавление соевого масла или неионного детергента (Noigen HC) приводило к увеличению содержания внеклеточной липазы в 56 раз [23].

ПАВ в составе питательной среды при культивировании продуцентов липаз могут оказывать разностороннее действие: и непосредственно на клетки, и на доступность нерастворимого в воде липидного индуктора для микроорганизма, и на процесс выделения фермента из клеток, и, возможно, на сам фермент.

Нами было исследовано влияние различных ПАВ на биосинтез липазы *Rh. oryzae* 1403 на фоне среды (%): соевый жмых – 2; кукурузный экстракт – 1.0; $(NH_4)_2HPO_4$ – 0.5 и подсолнечное масло – 0.5. Результаты, представленные в табл. 2, показывают, что ПВС и фосфатидный концентрат оказывали слабое влияние на биосинтез липазы грибом. Отрицательное действие проявлял бридж. Тритоны сильно отличались по эффекту. При добавлении тритона Х-100 удалось повысить активность фермента в 1.35 раза.

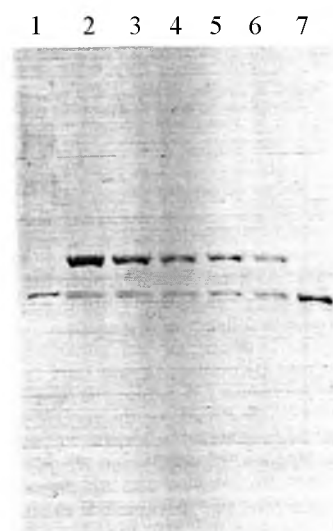
Исследования состава липолитического комплекса *Rh. oryzae* 1403 при культивировании на средах с добавлением различных индукторов и без них показали, что на пептонно-солевой среде и с твином 20 образовывалась одна форма липазы. При введении в питательную среду оливкового масла, олеиновой кислоты и других твинов синтезировалась еще одна форма липазы (рис. 2).

Для *Candida rugosa* А.Т.С.С. 14830 также показано, что профиль изоформ сильно зависит от состава среды. На питательной среде без липидов была обнаружена одна форма липазы, при добавлении твина 20 выявилась еще одна форма фермента, а в присутствии твина 80 идентифицирована совершенно иная липаза [16].

Таблица 2
Влияние ПАВ на биосинтез липазы
грибом *Rh. oryzae* 1403

Наименование ПАВ	Массовая доля ПАВ, %	ЛА, ед./см ³	ЛА, %
Среда без ПАВ	–	66.8	100
ПВС	0.1	70.5	105
Фосфатидный концентрат	0.1	69.7	104
Тритон X-100	0.1	76.8	115
	0.01	90.2	135
Тритон X-405	0.1	59.3	89
	0.01	63.5	95
Бридж 35	0.1	16.7	25
	0.01	23.4	35
Бридж 58	0.1	13.0	20
	0.01	20.1	30

Разносторонние исследования образования множественности изоформ липазы проведены для *Candida rugosa*. Сначала у этого продуцента было описано два, а позже – семь генов, кодирующих липазы и эстеразы (пять из них - липазы). Они в настоящее время полностью охарактеризованы [18]. *Geotrichum candidum* F0401B образует внеклеточные липазы А и С, которые предпочтительно расщепляют связи по положениям *sn*-1,3- и *sn*-2-триацилглицерола соответственно [24]. Множественность изоформ липаз может быть обусловлена изменениями в экспрессии генов, различным количеством ковалентно связанных углеводов, частичным протеолизом и другими трансляционными модификациями. Отмечается, что гетерогенность изоформ липаз, обнаруженных у грибов и дрожжей, может быть частично связана с гетерогликозилированием и нековалентными ассоциациями гликозидных примесей с липазным компонентом [25, 26].



Липазы *Rhizopus oryzae* 1403 были получены в гомогенном виде с помощью последовательных стадий гель-фильтрации на Sephadex G-150 и ионообменной хроматографии на ДЭАЭЦ ДЕ-52. Гомогенность ферментов подтверждена повторной гель-фильтрацией и электрофорезом. Удельная активность составила для Липазы I 3600 и Липазы II 2150 ед./мг белка.

Рис. 2. Выявление липазы после электрофореза фильтрата культуральной жидкости при выращивании *Rh. oryzae* 1403 на различных средах: 1 – пептонно-солевая; 2 – с соевым жмыхом без тритона; 3 – то же, с тритоном X-305; 4 – пептонно-солевая с твином 80; 5 – то же с твином 60; 6 – то же с твином 40; 7 – то же с твином 20

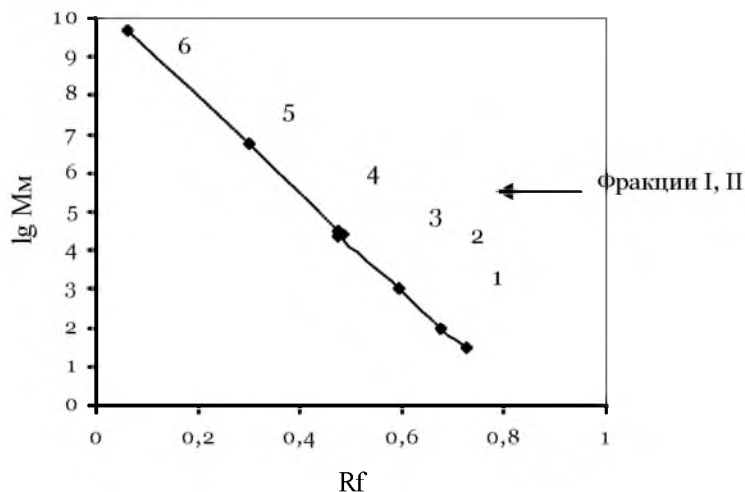
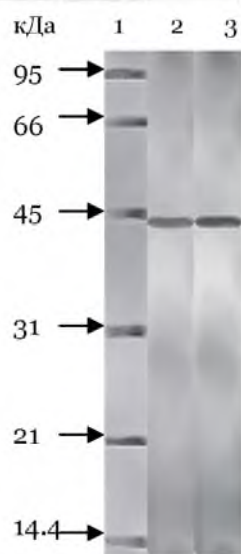


Рис. 3. Определение молекулярной массы липаз: а) – электрофорез: 1 – маркерные белки; 2 – Липаза I; 3 – Липаза II; б) – калибровочный график: 1 – лизоцим; 2 – соевый ингибитор трипсина; 3 – карбоангидраза; 4 – овальбумин; 5 – сывороточный альбумин; 6 – целлюлаза



Молекулярная масса Липаз I и II, определенная гель-фильтрацией на Sephadex G-150, находилась в пределах 40–45 кДа. Исследования молекулярной массы методом электрофореза в присутствии SDS показали, что она практически была одинаковой у двух изоферментов и равнялась 44 ± 2 кДа (рис. 3).

Аминокислотный состав Липазы I и Липазы II представлен в таблице 3.

Таблица 3
Аминокислотный состав (%)
липаз *Rhizopus oryzae* 1403

Аминокислота	<i>Rhizopus oryzae</i> 1403		<i>Rhizomucor miehei</i> [258]
	Липаза I	Липаза 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
Ile	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
Trp	0.88	1.05	1.84

В обоих изоферментах содержание неполярных аминокислот (35,77 и 35,50%) было невысоким. Подобные данные сообщены для липазы *Rh. delemar* и *Humicola lanuginosa* [27], *Mucor hiemalis* [28], *Candida parapsilosis* [29]. Гидрофобных аминокислот в изоферментах было больше в 1,34–1,4 раза, чем полярных заряженных. У липаз *Rh. microsporus* количество неполярных остатков было больше полярных в 1,3–1,6 раза [30, 31]; для панкреатических липаз свиньи и крысы оно практически одинаково [32].

Между изоформами наблюдалось большое соответствие в аминокислотном составе за исключением Asx, Pro, Glx, Arg, Ser и Val. Подобие состава аминокислот наблюдается иногда не только между изоферментами, но и видами, принадлежащими к одному роду грибов. Высокое сходство (около 50 %) у липаз *Rh. oryzae* 1403 наблюдается с липазой *Rhizomucor miehei* [33].

Заключение

Таким образом, доказано, что биосинтез липаз микромицетом *Rh. oryzae* 1403 носит индуцибельный характер. С большой достоверностью можно утверждать, что этот продуцент способен синтезировать два липолитических фермента. По всей видимости, в данном случае происходит контроль на уровне экспрессии генов липазы.

Список литературы

- Zhang Y., Liu J., Qiu L., Shi Y., Su Z., Xia Y., Li F. Optimisation of cultivation conditions of a mutant of *Trichosporon laibachii* CBS 5791 for enantioselective resolution of ketoprofen ester // *Ann. Microbiol.* – 2005. – Vol. 55. – № 2. – P. 101–106.
- Iwai M., Tsujisaka Y., Okamoto Y., Fukumoto Y. Lipid requirement for lipase production by *Geotrichum candidum* // *Agr. Biol. Chem.* – 1973. – Vol. 37. – № 4. – P. 929–931.
- Рубан Е. Л. Микробные липиды и липазы. – М.: Наука, 1977. – 216 с.
- Вепозола А. О., Лука В. Т. Сравнительное изучение влияния растительных масел и ПАВ на биосинтез липазы дрожжами *Candida parapsilosis* 739 // Влияние условий культивирования на активность продуцентов. – Рига, 1980. – С. 156–159.
- Yang X.-h., Yin C.-h., Fu S.-z., Wang B.-w., Tan T.-w. Оптимизация культуральной среды для продукции липазы иммобилизованными клетками *Rhizopus arrhizus* и свойства липазы // *Zhongguo youzhi = China Oils and Fats.* – 2004. – Vol. 29. – № 7. – P. 29–32.
- Ксандопуло Г. Б. Влияние некоторых жиров и поверхностно-активных веществ на липазную активность грибов рода *Geotrichum* // *Микробиол.* – 1974. – Т. 43. – № 6. – С. 1001–1004.
- Dalmau E., Montesinos J. L., Lotti M., Casas C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa* // *Enzyme Microb. Technol.* – 2000. – Vol. 26. – № 9-10. – P. 657–663.
- Yasser Refaat A.-F. Optimization of thermostable lipase production from a thermophilic *Geobacillus* sp. using Box-Behnken experimental design // *Biotechnol. Lett.* – 2002. – Vol. 24. – № 14. – P. 1217–1222.
- Zhang L. Y., Wei D. Z., Tong W. Y. Effective inducers for lipase production by *Candida rugosa* // *Ann. Microbiol.* – 2003. – Vol. 53. – № 4. – P. 499–504.
- Dai D., Xia L. Enhanced production of *Penicillium expansum* PED-03 lipase through control of culture conditions and application of the crude enzyme in kinetic resolution of racemic allethrolone // *Biotechnol. Progr.* – 2005. – Vol. 21. – № 4. – P. 1165–1168.
- Hasan F., Shah A. A., Hameed A. Influence of culture conditions on lipase production by *Bacillus* sp. FH5 // *Ann. Microbiol.* – 2006. – Vol. 56. – № 3. – P. 247–252.



12. Султанова И. Г., Зубенко Т. Ф. Влияние некоторых поверхностно-активных веществ на биосинтез липазы грибом штамм *Rhizopus microsporus* УзЛТ-1 // Узбекский биолог. журн. – 1976. – № 5. – С. 71–72.
13. Haperburg D., Kleber H.-P. Extracelluläre lipase aus *Acinetobacter calcoaceticus* // Acta Biotechnologica. – 1982. – Vol. 2. – № 4. – P. 337–342.
14. Условия синтеза липазы *Planococcus migula* in vitro / Wang H.-j., Mei Z.-q., Liu X.-z., Huang Y.-b., Piao Z.-s. // Jilin daxue xuebao. Lixue ban = J. Jilin Univ. Sci. Ed. – 2002. – Vol. 40. – № 4. – P. 430–432.
15. Cloning and nucleotide sequence of two lipase genes from *Candida cylindracea* / Longhi S., Fusetti F., Grandon T., Lotti M., Vanoni M., Alberghina M. // Biochim. Biophys. Acta. – 1992. – Vol. 1131. – P. 227–232
16. Chang R.-C., Chou S.-J., Shaw J.-F. Multiple forms and functions of *Candida rugosa* lipase // Biotechnol. Appl. Biochem. – 1994. – Vol. 19. – P. 93–97.
17. Ibrik A., Chahinian H., Rugani N. et al. Biochemical characterization of triacylglycerol lipase from *Penicillium cyclopium* // Lipids. – 1998. – Vol. 33. – P. 377–384.
18. Characterization of the lipase and esterase multiple forms in an enzyme preparation from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation / Sanchez A., Ferrer P., Serrano A., Pernas M. A., Valero F., Rúa M. L., Casas C., Solà C. // Enzyme Microb. Technol. – 1999. – Vol. 25. – № 3–5. – P. 214–223.
19. Гааль Э. Электорофорез в разделении биологических макромолекул. – М.: Мир, 1982. – 446 с.
20. Дегерман Г. Гель-хроматография. – М.: Мир, 1970. – 320 с.
21. Yamada K., Machida H. // Nippon Nōgeikagaku Kaishi (in Japanese). – 1992. – Vol. 36. – P. 858–860.
22. Lin S.-F., Chion C.-M., Tsai Y.-C. Effect of triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111 // Biotechnol Lett. – 1995. – Vol. 17. – № 9. – P. 959–962/
23. Increased production of lactonizing lipase (Lip I) from *Pseudomonas* sp. strain 109 by lipids and detergents / Tanaka J., Sudo T., Ihara F., Nihira T., Yamada Y. // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1999. – Vol. 63. – № 5. – P. 900–904.
24. Ota Y., Sawamoto T., Hasuo M. Tributyrin specifically induces a lipase with a preference for the sn-2 position of triglyceride in *Geotrichum* sp. FO401B // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2000. – Vol. 64. – № 11. – P. 2497–2499.
25. Purification, characterization, and crystallization of two types of lipase from *Rhizopus niveus* / Kohno M., Kugimiya W., Hashimoto Y., Morita Y. // Bioici. Statech. Blochem. – 1994. – Vol. 58. – № 6. – P. 1007–1012.
26. Variability within the *Candida rugosa* lipases family / Lotti M., Tramontane A., Longhi S, Fusetti F., Brocca S., Pizzi E., Alberghina L. // Protein Engineering. – 1994. – Vol. 7, № 4. – P. 531–535.
27. 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* / Derewenda U., Swenson L., Green R. et al. // J. Lipid Res. – 1994. – Vol. 35. – P. 524–534.
28. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *hiemalis* / Hiol A., Jonzo M. D., Druet D., Comeau L. // Enzyme Microb. Technol. – 1999. – Vol. 25. – № 1-2. – P. 80–87.
29. The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*: molecular cloning, purification and characterization of purified recombinant enzymes / Neugnot V., Moulin G., Dubreucq E., Bigey F. // Eur. J. Biochem. – 2002. – Vol. 269. – P. 1734–1734.
30. Некоторые свойства внеклеточной липазы *Rhizopus microsporus* УзЛТ-3 / Давранов К.Д., Куйлибаев И.Т., Розмухамедова Б.Х., Махсумханов А.А. // Прикл. биох. и микробиол. – 1995. – Т. 31. – № 4. – С. 405–411.
31. Очистка и свойства внутриклеточных липаз гриба *Rhizopus microsporus* / Диевов Ж.Х., Циоменко А.Б., Давранов К.Д., Кулаев И.С. // Биотехнол. – 1993. – № 7. – С. 26–30.
32. Брокерхоф К., Дженсен Р. Липолитические ферменты. – М.: Мир, 1978. – 396 с.
33. Herrgard S., Gibas C. J., Subramaniam S. Role of an electrostatic network of residues in the enzymatic action of the *Rhizomucor miehei* lipase family // Biochemistry. – 2000. – Vol. 39. – № 11. – P. 2921–2930.

INDUCTION OF BIOSYNTHESIS LIPASES *RHIZOPUS ORYZAE* 1403

S.A. Shelamova¹, Y.A. Tyrsin²

¹Voronezh State Engineering
Technology University,
Revolutsii St., 19, Voronezh,
394017, Russia
E-mail: shelam@mail.ru

²Moscow State of Food Production
University, Volokolamskoe St., 11,
Moscow, 125080, Russia

Biosynthesis lipases *Rh. oryzae* 1403 induced triglycerides, greasy acids and their by derivative - twins. The activity was increased in 2,3–4,0 times. The highest effect have given olive oil, twin 80 and olein acid. The not polysated greasy acids and oxiacids on this background were allocated with smaller positive influence: the linen oil gave increase of activity in comparison with pepton-salt environment in 2,7 times, and castor oil – in 1,4 times. Superficial-active substances strongly differed on effect. This продуцент is capable to synthesize two lipases. Molecular weight was identical at two izoenzymes and was equaled 44 кДа. Between izoenzymes the large conformity in aminoacid structure behind exception Asx, Pro, Glx, Arg, Ser и Val.

Key words: lipase, *Rhizopus*, biosynthesis.