

## ПРЕПАРАТ ЛИПАЗЫ *MUCOR RACEMOSUS* И НЕКОТОРЫЕ ЕГО СВОЙСТВА\*

*Аннотация.* Из культуральной жидкости *Mucor racemosus* осаждением сульфатом аммония получен технический препарат липазы. Изучены: оптимальные условия действия, стабильность при изменении кислотности среды и температуры, влияние ионов металлов на активность препарата липазы *Mucor racemosus*. Показано, что оптимум липазной активности отмечен при pH 6,0. Оптимальная температура действия 37<sup>0</sup>. Липаза *Mucor racemosus* отличается высокой термо- и pH-стабильностью. Приведены данные о влиянии ионов некоторых металлов.

*Ключевые слова:* *Mucor racemosus*, культуральной жидкости, липаза, стабильность.

В последнее время возрос интерес к одному из важнейших гидролитических ферментов – липазе. Фермент липаза-триглицеридгидролаза (КФ 3.1.1.3) широко распространен среди грибных микроорганизмов. Известно значительное количество продуцентов липазы, относящихся к родам *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* и др., изученных в различной степени [1; 2; 3].

Перспективы практического применения липаз делают целесообразным исследование таких свойств липазы, как субстратная специфичность, оптимальные условия действия, стабильность при изменении кислотности среды и температуры. Многочисленные исследования посвящены изучению оптимальных условий действия липаз микроорганизмов, а также свойствам липазы как ферментного белка [4; 5; 6; 7].

Настоящая работа посвящена изучению некоторых свойств препарата липазы *Mucor racemosus*.

Для получения технического препарата липазы использовали гриб *Mucor racemosus*, выделенный из нефтезагрязненных почв Апшерона. Исходным материалом для выделения липазы служила отфильтрованная от мицелия культуральная жидкость после выращивания гриба в колбах объемом 0,75 л. При осаждении липазы серноокислым аммонием раствор после добавления соли выдерживали в течение 16 час. при +4. Сформировавшийся осадок отделяли сепарированием, растворяли в минимальном объеме 0,005 М фосфатного буфера pH 7,0 и диализовали сначала против проточной водопроводной воды, а затем против 0,005 М фосфатного буфера pH 7,0 до полного удаления ионов SO<sup>2-</sup> (отрицательная реакция с BaCl<sub>2</sub>)

Активность липазы определяли титрометрическим методом, в котором в качестве субстрата используется эмульсия оливкового масла. Реакционная смесь состоит из 5 мл эмульсии оливкового масла в 2%-м растворе поливинилового спирта и 4 мл фосфатно-цитратного буфера (pH 7,0) и 1 мл раствора фермента. Липолиз проходит в стационарных условиях в течение часа при 37<sup>0</sup>. Реакция останавливается добавлением 30 мл этанола, продукты гидролиза оттитровываются 0,05 н. раствором NaOH в присутствии 1%-го спиртового раствора фенолфталеина. За единицу липазной активности принимается такое количество фермента, которое отщепляет 1 мкмоль олеиновой кислоты от 40%-й эмульсии оливкового масла за 1 час при 37<sup>0</sup> [8]. Содержание белка определяли по методу Лоури [8].

Исследуемый препарат липазы имел активность 350 тыс. ед./г, содержание белка

\* © Ашрефи Ф.Дж., Касумова С.Ю., Агабекова Р.А.

– 30,5%.

Известно, что каждый индивидуальный фермент проявляет свое действия только в определенной зоне рН, и наибольшая активность его проявляется в довольно узких пределах. Для выяснения оптимального значения рН субстрата, при котором гидролиз происходит наиболее активно, был проверен диапазон рН от 2,0 до 9,0 на субстрате – эмульсии оливкового масла с поливиниловым спиртом. Величину рН субстрата устанавливали фосфатно-цитратным буфером. Зависимость активности липазы от рН субстрата показана на рис. 1. Наибольшая активность наблюдалась при рН 6,0; при рН 7,0 интенсивность гидролиза несколько понижалась и заметно падала при 8,0- 9,0. Таким образом, липаза *Mucor racemosus* действует в достаточно широком диапазоне рН, проявляя оптимальную активность при рН: 6,0. При исследовании температурного оптимума липазы мы исследовали прежде всего ее термостабильность. Для этого раствор фермента (1: 1000) выдерживали при различных температурах: 30,40,50,60,70,80 и 90° в течение 10, 30, 60, 120, 180 мин. И затем определяли активность липазы.

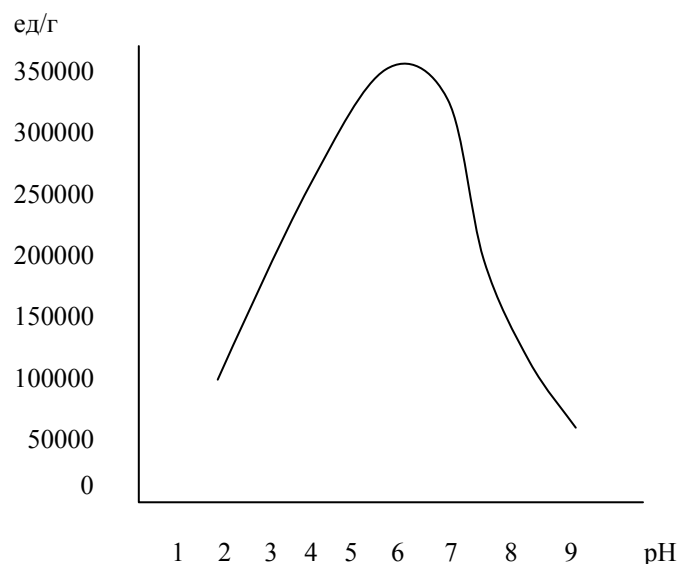


Рис.1. Активность липазы *Mucor racemosus* в зависимости от рН субстрата

На рис. 2 представлены данные, характеризующие влияние температуры и времени экспозиции на стабильность липазы.

Рассматривая зависимость активности липазы от длительности экспозиции при различных температурах, нетрудно заметить, что при температурах от 30 до 60° ферментативная активность сохранялась полностью в течение 3 час. Препарат липазы оказался устойчивым даже после нагревания при 70° в течение 10 мин., лишь при выдерживании раствора фермента в течение 30 мин при 70° активность его снижалась на 50%, за 60 мин – на 75%, за 120 мин. – на 80%. Даже после 180 мин. экспозиции при 70° сохранялась 15% активности липазы. При 80° полная инактивация препарата наступала лишь через 60 мин. Таким образом, раствор липазы проявлял высокую стабильность в зоне относительно высоких температур.

При определении температурного оптимума препараты липазы было обнаружено, что оптимальная температура равна 37° (рис. 3).

Падение кривой при температурах выше оптимальной протекало постепенно и более плавно, чем подъем на участке от 25 до 37°.

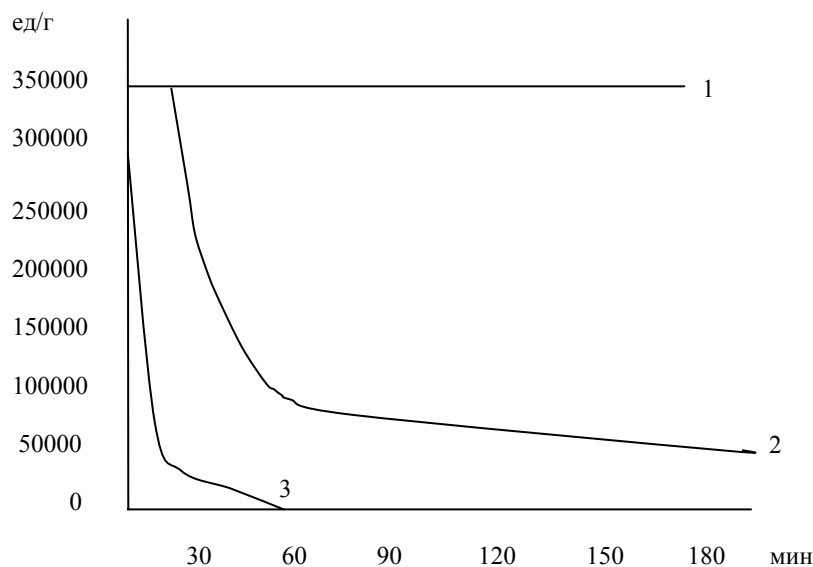


Рис. 2. Термостабильность липазы  
1- $t = 30^{\circ}$ ,  $40^{\circ}$ ,  $50^{\circ}$ ,  $60^{\circ}$ ; 2-  $t = 70^{\circ}$ ; 3-  $t = 80^{\circ}$

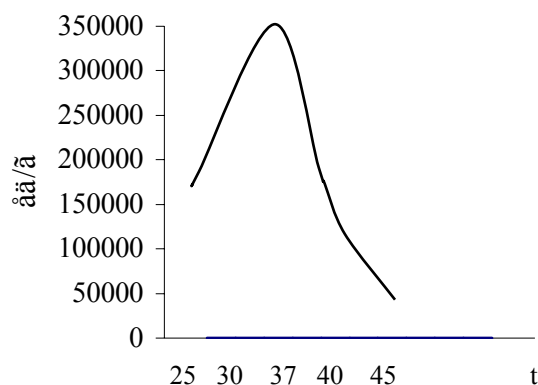


Рис. 3. Активность липазы при различной температуре

Для выяснения зон стабильности препарата липазы готовили буферные смеси с помощью фосфатно-цитратного буфера с различным значениям pH, от 2,0 до 10,0. Ферментный раствор выдерживали в буфере в течение 2 час., после чего определяли активность при pH реакционной смеси 7,0 согласно методике. В исследованном диапазоне pH при двухчасовой экспозиции ферментный раствор достаточно стабилен. Зона 100%-й стабильности находится в пределах от 5,0 до 10,0. При pH 2,0 наблюдалось снижение активности на 10%.

Как известно, важное значение для применения фермента имеет присутствие в реакционной смеси ионов металлов, активирующих или ингибирующих его [2; 6].

В наших исследованиях были испытаны  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{1+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  в концентрациях от  $2 \times 10^{-2}$  до  $10^{-5}$  М в виде солей  $\text{NaCl}$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ . Время экспозиции фермента в растворе соли – 30 мин. Как показали результаты исследований, присутствие в смеси  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  не оказало никакого влияния на активность липазы. Ионы  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  в больших концентрациях активировали на 6-8% липазу препарата.  $\text{Na}^{1+}$  несколько снижал актив-

ность препарата. Ингибирующий эффект проявили ионы  $Ba^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  - 25% потери активности. Ртуть в концентрации  $2 \times 10^{-2}$  и  $2 \times 10^{-5}$  М снижала активность липазы на 78 и 40% соответственно.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Long Kamariah, Ghazali Hasanah M., Arif Arbakariya, Che Man Yaakob, Bucke Christopher. Substrate preference of mycelium-bound lipase from strain of *Aspergillus flavus* Link. // *Biotechnol. Lett.* – 1998. – 20, № 4. – С. 369-372.
2. Давранов К., Халамейзер В.Б. Современное состояние микробных липаз // *Химия природных соединений.* – 1977. – № 2. – С. 150-169.
3. Рубан Е.Л. Микробные липиды и липазы. – М.: Наука, 1977. – 216 с.
4. Казанина Г.А., Петрова Л.Я., Селезнева А.А. и др. Выделение и некоторые свойства липазы *Geotrichum asteroides* ВКМ F-144 // *Прикладная биохимия и микробиология.* – Т. XVII, вып. III, 1981. – С. 516-522.
5. Казанина Г.А., Петрова Л.Я., Селезнева А.А. и др. Сравнительное изучение свойств липаз микробного происхождения // *Прикладная биохимия и микробиология.* – Т. XII, вып. III, 1976. – С. 537-540.
6. Лобырева Л.Б., Марченкова А.И. Характеристика липаз, содержащихся в культуральной жидкости *Penicillium Roqueforti* // *Микробиология.* – Т. 50, вып. I, 1981. – С. 90-95.
7. Davranov K.D., Makhsumkhanov A.A., Alimova B.Kh., Gulamova K.A., Turabekova N.M. Purification and characterization of two lipase forms from *Penicillium melinii* UzLM-4 // *Int. Symposium "Modern Problems of Microbial Biochemistry and Biotechnology"*, Pushchino, 25-30 June, 2000: Programme and Abstracts. – С. 106.
8. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 240 с.

F. Ashrefi, S. Khasimova, R. Akhabekova

#### MUCOR RACEMOSUS LYPASE PREPARATION AND SOME OF THEIR FEATURES

*Abstract.* From culture liquid *M. racemosus* with  $(NH_4)_2SO_4$  precipitation technical lypase preparation has been obtained and optimal conditions of its activity, stability, at medium acidity and temperature and influence of metal ions on ferment activity have been studied. The optimum of lypase activity *M. racemosus* differs for its thermo and pH stability. Data on ion influence of some metals has been studied.

*Key words:* Mucor racemosus, culture liquid, lypase, stability.