

**Мурадов П.З., Касумова С.Ю., Ашрефи Ф.Дж.,
Гасанов Х.А., Хорасани М.М., Намазов Н.Р.**

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД НА БИОСИНТЕЗ НЕКОТОРЫХ ГИДРОЛАЗ МИКРОМИЦЕТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ АЗЕРБАЙДЖАНА*

Аннотация: Исследовано влияние питательной среды на биосинтез некоторых гидролаз (липаза, протеаза, лецитиназа) микромицетами, выделенными из нефтезагрязненных почв Азербайджана. Установлено, что активность исследуемых ферментов, образуемых грибами, в большой степени зависит от состава среды. Так высокая липолитическая активность у *Mucor* sp.10 наблюдалась лишь на средах с соевой мукой и растительными маслами. Наилучшие результаты в отношении протеолитической активности у *Mucor* sp. 30a получены при добавлении в питательную среду кукурузной муки в концентрации 1,5-2%. Наиболее благоприятной средой для максимального накопления лецитиназы грибом *Aspergillus* sp.26.15b является 50Б сусло.

Ключевые слова: микромицеты нефтезагрязненные почвы, биосинтез, липаза, протеаза.

В настоящее время изучению воздействия нефтяного загрязнения на численность, видовой состав, а также физиолого-биохимические свойства микромицетов уделяется большое внимание [1-2]. Работы, касающиеся ферментативной активности микромицетов нефтезагрязненных почв, в литературе немногочисленны. Нами ранее было проведено изучение ферментативной активности 69 штаммов микромицетов, выделенных из нефтезагрязненных почв Азербайджана, в результате которого были отобраны наиболее активные штаммы [3]. Данная работа посвящена изучению влияния питательной среды на ферментативную активность отобранных штаммов грибов.

Объектом изучения служили *Mucor* sp.10, *Mucor* sp. 30a, *Aspergillus* sp.26.15b, отобранные нами как наиболее активные в отношении липолитической активности (ЛА), протеолитической активности (ПА) и лецитиназной активности (ЛЦА) [3]. Культуры поддерживали на сусло-агаре, а для опытов выращивали в колбах Эрленмейера емкостью 500мл, содержащих 50мл питательной среды. Грибы культивировались на качалке (120 об/мин) в течение 7 суток при температуре 25-27°C. Состав сред менялся в зависимости от цели опыта.

Липолитическую активность определяли титрометрическим методом и выражали в условных единицах- мл 0,05 н NaOH, пошедшей на титрование образовавшихся за 1 час жирных кислот в 1 мл культуральной жидкости. (4). В качестве субстрата для определения ЛА использовали 40% эмульсии оливкового масла в 2% ПВС.

Протеолитическую активность определяли по изменению скорости истечения 5%-го раствора желатин в вискозиметре, и по количеству тирозина, полученного при гидролизе казеина [5].

Лецитиназную активность определяли методом разведения, используя в качестве субстрата лецитовителлин куриного яйца. В каждую пробу вносили 0,2 мл лецитовителлина и 1мл фильтрата или соответствующие разведения. Смесь инкубируют 2-4 часа при 37°C. Реакцию учитывали по диглицеридному кольцу, всплывающему на поверхность пробы в результате ферментативного гидролиза лецитина куриного яйца. Лецитиназную

* © Мурадов П.З., Касумова С.Ю., Ашрефи Ф.Дж., Гасанов Х.А., Хорасани М.М., Намазов Н.Р.

активность выражали в лецитовителлиновых единицах, соответствующих тому наибольшему разведению, которое давало четко оформленное кольцо [6].

В нашей работе изучались условия культивирования *Mucor sp.10*, способные оптимизировать биосинтез экзолипазы этим грибом. В табл. 1 представлены результаты опытов по выяснению влияния состава питательной среды на биосинтез экзолипазы грибом *Mucor sp.10*.

Как видно из таблицы 1, высокая экзолипазная активность наблюдалась лишь на средах с маслами и соевой мукой.

В литературе часто встречаются данные об индукции липаз микроорганизмов жирными кислотами и маслами [7-8]. Нами было проверено индуцирующее действие различных жирных кислот и масел на синтез липазы *Mucor sp.10*, выращенного на сусле. Из данных табл.2 видно, что жирные кислоты не являются индуктором биосинтеза липазы *Mucor sp.10*. Масла же индуцируют биосинтез фермента лучше или хуже в зависимости от их природы и концентрации в среде: оливковое, соевое и хлопковое лучше при концентрации 0,5%, а подсолнечное при- 0,05%.

Таблица 1

Влияние состава сред на биосинтез экзолипазы *Mucor sp.10*

Среды	Липолитическая активность (мл 0,05н NaOH/мл КЖ)
1. Чапек+сахароза	0,6
2. Чапек + соевая мука	9,7
3. Чапек+глюкоза	0,3
4. Чапек+сахароза+оливковое масло	1,8
5. Чапек+глюкоза+оливковое масло	0,2
6. Чапек+соевая мука+оливковое масло	5,5
7. Чапек+ пептон	0,4
8. Сусло	1,2
9. Сусло+оливковое масло	3,8

Таблица 2

Влияние различных жирных кислот и масел на биосинтез экзолипазы грибом *Mucor sp.10*.

Индуктор	Липолитическая активность мл (0,05н NaOH/мл КЖ при дозе индуктора)		Индуктор	Липолитическая активность мл (0,05н NaOH/мл КЖ при дозе индуктора)	
	0,5%	0,05%		0,5%	0,05%
Лауриновая кислота	0,5	0,6	Оливковое масло	4,0	3,5
Олеиновая кислота	1,2	1,0	Соевое масло	2,5	0,5
Маргариновая кислота	0	0,2	Хлопковое масло	1,6	0,4
Пальмитиновая кислота	0,4	0,4	Подсолнечное масло	1,6	2,1
Стеариновая кислота	0,9	1,2	Контроль -сусло	1,2	-

Для выявления условий биосинтеза экзолипазы гриба *Mucor sp.10* выращивали на двух средах в различных условиях аэрации и температуры в течение 6 суток. Оптимальной температурой для биосинтеза липазы *Mucor sp.10* является 26-28° и для биосинтеза липазы гриба нуждается в сильной аэрации.

Изучение динамики накопления липазы в зависимости от возраста культуры пока-

зало, что накопление липазы в культуральной жидкости у *Mucor* sp.10 происходило пропорционально приросту биомассы. Максимальная ЛА обнаруживалась на 2,4-е или 5-е сутки развития в зависимости от состава среды. Из полученных данных также видно, что гриб синтезирует преимущественно экзолипазу, эндолипазы накапливается очень незначительное количество.

Так как согласно литературным данным, бикарбонат натрия и глицерин широко используется в качестве компонента питательных сред для культивирования продуцентов ЛЦС (9), нами также было испытано влияние NaHCO_3 и глицерина на лецитиназную активность *Aspergillus* sp.26.15b. Как видно из таблицы №3, на среде Чапека и среде Чапека с 1% глицерином лецитиназная активность достигала 16 LW/мл, т.е. глицерин не влиял на активность фермента. Введение NaHCO_3 в питательную среду уменьшало лецитиназную активность и при 0,5% NaHCO_3 – активность отсутствовала. Глицерин и NaHCO_3 , добавленные в 5⁰Б сусло также снижали ферментативную активность *Aspergillus* sp.26.15b. Таким образом, 5⁰Б сусло является наиболее благоприятной средой для максимального накопления лецитиназы грибом *Aspergillus* sp.26.15b.

Таблица 3

Влияние состава среды на лецитиназную активность мицелия
Aspergillus sp.26.15b.(LW/мл)

Среда	лецитиназная активность
1. Чапек	16
2. Чапек + 1% глицерин	16
3. Чапек + 0,2% NaHCO_3	8
4. Чапек + 0,5% NaHCO_3	0
5. Сусло 5 ⁰ Б	32
6. Сусло + 2% сахароза + 1% глицерин	16
7. Сусло + 0,2% NaHCO_3	16
8. Сусло + 0,5% NaHCO_3	16

Была изучена динамика накопления лецитиназы грибом *Aspergillus* sp.26.15b на среде сусло 5⁰ Б. Максимальный выход лецитиназы обнаружен на 5-6 сутки развития гриба при выращивании на 5⁰ Б сусле с рН = 7,0. При увеличении рН до 9,0 лецитиназная активность не обнаруживается.

Ввиду низкой активности протеолитических ферментов гриба *Mucor* sp. 30a, полученной на контрольной среде - Чапека было испытано влияние белковых добавок на синтез протеаз данным грибом. К среде Чапека добавляли кукурузную и соевую муку в концентрациях 0,5,1,1,5,2%. Протеолитическую активность определяли в культуральной жидкости. Как видно из таблицы 4, внесение в среду органических добавок в виде соевой и кукурузной муки вызывало как значительное увеличение выхода биомассы, так и повышение активности *Mucor* sp. 30a. Добавление соевой муки сказывалось на увеличении биомассы мицелия и в меньшей степени на повышении активности протеаз. Напротив, внесение в среду кукурузной муки значительно усилило синтез протеаз, особенно в концентрации 1,5 и 2%. Таким образом, обогащение питательной среды белковыми добавками значительно усилило синтез протеолитических ферментов у гриба *Mucor* sp. 30a.

Гидролиз желатины и казеина грибом *Mucor* sp. 30a

Варианты сред	Гидролиз желатины, сек	Тирозин, мкг	Сухой вес мицелия, г/л
Контрольная (К)	40	17,5	2,5
К+0,5% кукурузная мука	45	37	3,0
К+ 1% кукурузная мука	49	50	3,3
К+ 1,5% кукурузная мука	52	65	3,6
К+ 2% кукурузная мука	55	78,5	4,5
К+0,5% соевая мука	42	29	3,5
К+1% соевая мука	45	38	4,2
К+1,5% соевая мука	49	59	4,5
К+2% соевая мука	51	68,5	4,95

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Киреева Н.А., Галимзянова Н.Ф. Влияние загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами на численность и видовой состав микромицетов. // Почвоведение. 1995. №2. С. 211-216.
2. Киреева Н.А., Галимзянова Н.Ф., А.М. Мифтахова. Микромицеты почв, загрязненных нефтью, и их фитотоксичность. // Микология и фитопатология. Т. 34. Вып. 1. 2000. С.36-41.
3. Касумова С.Ю., Намазов Н.Р., Хоросани М.М., Гасанов Х.А., Мурадов П.З. Ферментативная активность микромицетов, выделенных из нефтезагрязненных почв Азербайджана. / Современные проблемы экологии и экологического образования. Материалы междунар. н/п конф., Орехово-Зуево, 2009, с. 107-112
4. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. М.: Легкая и пищевая промышленность. 1982. 240 с.
5. Методы экспериментальной микологии. Киев «Наукова думка». 1982.
6. Флуер Ф.С., Езепчук Ю.В. Образование лецитиназы *Bacillus cereus*. // Микробиология, 1970, т. 39, вып.3, с.465-470.
7. Рубан Е.Л., Ксандопуло Г.Б., Мурзина Л.П. Условия биосинтеза элзолипазы грибом *Oospora flagrans*. // Прикл. биох. и микроб., 1978, т. 14, вып.6, с.849-857.
8. Свириденко Ю.Я., Уманский М.С., Кузнецов Е.С., Козаков Г.А., Лобырева Л.Б. Влияние состава среды на биосинтез и свойства экзолипаз микроорганизмов. // Микробиология, 1978, т. 47, вып.5, с. 677-682.
9. Герасимене Г.Б., Макарюнайте Ю.П., Кулене В.В., Глемжа А.А. Биосинтез внеклеточной лецитиназы *B. cereus* в зависимости от состава питательной среды и pH. // Прикл. биох. и микроб, 1980, т. XVI, вып. 4, стр. 523-529.

P. Muradov, S. Khasimova, F. Ashrefi, Gh. Hasanov, M. Horasani, N. Namazov
 THE EFFECT OF GROWTH MEDIUMS ON BIOSYNTHESIS OF SOME HYDROLASES OF MICROMYCETES ISOLATED FROM OIL POLLUTED SOILS OF AZERBAIJAN

Abstract: There was researched the influence of nutrient medium on biosynthesis of some hydrolases (lipase, protease, lecithinase) by micromycetes isolated from oil polluted soils of Azerbaijan. It was defined that the activity of the researched ferments, formed by fungi, to a large extent depends on the medium structure. A high hydrolytical activity of *Mucor* sp.10 was observed only on the medium consisted of corn flour and oils. The best results in the respect with proteolytical activity were obtained at addition of a 1,5-2% concentration corn flour to a nutritive medium. The most favorable medium for a maximum accumulation of lecithinase by *Aspergillus* sp.26.15b turns to be 50B wort.

Key words: micromycetes from oil polluted soils, biosynthesis, lipase, protease.