

**А.А. Десятник<sup>1</sup>, Ж.П.Тюрина<sup>1</sup>, С.В. Лаблюк<sup>1</sup>,  
О.А. Болога<sup>2</sup>, А.Г. Лазареску<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Институт микробиологии и биотехнологии АНМ, ул. Академическая 1, МД-2028, Кишинев, Молдова, тел: (373 22)725754, e-mail: cnmmoldova@yahoo.com

<sup>2</sup> Институт химии АНМ, Академическая, 1, Кишинев, Молдова

## **ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА ЛИПАЗ ШТАММОМ *ASPERGILLUS NIGER* CNMN FD 01L НА СРЕДАХ ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА**

*Приведены сведения по использованию комплексных соединений (КС) микроэлементов для регуляции биосинтеза микробных липаз. Штамм *Aspergillus niger* CNMN FD 01L, отобранный как перспективный продуцент внеклеточных ферментов липолитического действия, синтезирует неспецифические липазы, гидролизующие все эфирные связи триглицеридов независимо от их положения. Установлено, что использование комплексного соединения не влияет на проявление максимума накопления липолитической активности, который наблюдается на 5 сутки культивирования продуцента как в контрольной, так и в оптимизированной вариантах сред и составляет 12558 ед/мл и 17731 ед/мл, соответственно.*

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** липазы, *Aspergillus niger*, комплексные соединения кобальта и железа, стимуляторы биосинтеза.

Липазы (К.Ф.3.1.1.3 — триацил-глицерол-гидролазы) играют важную роль в метаболизме липидов и регуляции липидзависимых функций в живых организмах и являются уникальной группой ферментов, поскольку катализируемые ими реакции протекают на границе раздела фаз в гетерогенной системе: масло — вода или мицелла — вода [1]. Это значительно повышает теоретический интерес к их изучению и расширяет границы их практического использования.

Благодаря своим гидролитическим способностям, они широко используются в кожевенной, масложировой промышленности, в сыроделии, в производстве моющих средств, лекарственных препаратов. Известны такие лечебные препараты, как фестал, мезим-форте и др., которые в качестве основного действующего начала содержат микробную липазу. Кроме того, в последние годы выявлено, что они обладают рядом еще и других уникальных особенностей — катализировать реакции этерификации и переэтерификации, ацилирования и алкилирования, осуществлять реакции синтеза глицеридов и т.д. [2,3,4].



В настоящее время для получения липаз, как и многих других ферментов, используют, в основном, микроорганизмы, которые осуществляют синтез этих веществ за короткий цикл развития и на доступных питательных средах [5,6]. Кроме того, большинство микроорганизмов обладают способностью продуцировать внеклеточные ферменты, активность которых во много раз превышает активность внутриклеточных [7].

Учитывая высокую потребность в микробных липазах в вышеназванных отраслях народного хозяйства и теоретический интерес к изучению и активации метаболических процессов их продуцентов, перспективными являются исследования по выявлению возможности регуляции и направленного синтеза липолитических ферментов микромицетов с помощью комплексных соединений микроэлементов.

Микроэлементы в составе минеральных солей не нашли широкого применения ни в медицине, ни в сельском хозяйстве ввиду их высокой токсичности и малой эффективности. Однако координационно-связанные микроэлементы, по своей структуре близкие к биологическим макромолекулам (гемоглобин, хлорофилл, миоглобин и др.), менее токсичны и более реакционноспособны [8] и могут быть использованы в качестве стимуляторов синтеза биологически активных веществ, что подтверждено исследованиями, проведенными на микроводорослях и цианобактериях [9].

Однако сведений по использованию комплексных соединений микроэлементов для регуляции биосинтеза микробных липаз очень мало, что делает актуальным проведение подобных исследований [10].

### Материалы и методы

Объектом биологических исследований служил штамм микромицета *Aspergillus niger* CNMN FD 01L, отобранный как перспективный продуцент внеклеточных ферментов липолитического действия. Штамм хранится в Национальной коллекции непатогенных микроорганизмов Республики Молдова при Институте микробиологии и биотехнологии АНМ.

Культивирование штамма осуществлялось при температуре 28 °С в конических колбах Эрленмейера объемом 750 мл, на качалке (180 — 200 об/мин), на среде подобранного состава (г/л): соевая мука — 35,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 5,0; pH 7,0-7,2; объем питательной среды — 100 мл. В качестве посевного материала использовалась водная суспензия спор 14-дневной культуры, выращенной на скошенной сусло-агаровой среде, в количестве 10 % от инокулированного объема в концентрации 10<sup>6</sup> спор/мл. Продолжительность культивирования продуцента составила 5 суток.

Для усиления биосинтетических способностей штамма использовались комплексные соединения кобальта и железа:  $[\text{Co}(\text{MgH})_2 \cdot \text{Py}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Co} \cdot \text{Digsemi} \cdot \text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeO}_3 \cdot \text{Met}$ .

В оптимизированные варианты сред комплексные соединения вносились в расширенном диапазоне концентраций: 5, 10, 15, 20, 30 мг/л. Среда без добавления комплексных соединений служила контролем.

Для выявления оптимальной продолжительности культивирования продуцент выращивался в течение 2, 3, 4, 5, 6 суток на среде, содержащей выявленную оптимальную концентрацию (15 мг/л) отобранного комплексного соединения.

Липолитическую активность определяли по расщеплению оливкового масла до олеиновой кислоты, используя модифицированный метод Ота-Ямада [11, 12].

За единицу активности липазы принимали такое количество фермента



(культуральной жидкости), которое освобождает 1 мкмоль олеиновой кислоты из 40 % эмульсии оливкового масла в поливиниловом спирте при рН 7,2 и температуре 37 °С в течение 1 часа.

### Результаты и их обсуждение

Микроорганизмы, находясь в постоянном контакте с внешней средой, приспособились быстро и точно реагировать на происходящие в ней изменения, перестраивая свои ферментные системы. Эта физиологическая изменчивость микроорганизмов позволяет использовать их для получения активных ферментов со специальными и заранее заданными свойствами, используя для этого различные факторы. Одним из таких факторов является применение комплексных соединений микроэлементов в качестве стимуляторов биосинтеза и стабилизаторов активности ферментов. Микромицет *Aspergillus niger* CNMN FD 01L в лаборатории энзимологии Института микробиологии и биотехнологии АНМ был отобран как перспективный продуцент липолитических ферментов. Изучены его физиолого-биохимические особенности и подобраны оптимальные условия культивирования [13].

Для повышения энзиматической активности штамма была исследована большая группа комплексных соединений Co, Fe, Ni, Cu, Zn и др. (около 55), содержащих в составе лигандов пиридин, анилин, тиокарбамид, метил- и диметилглиоксим, аминокислоты (метионин, глицин, валин) и т.д.

Полученные результаты показали, что использованные комплексные соединения могут оказывать на процесс липолиза как ингибирующее, так и стимулирующее воздействие. При этом получаемый эффект определяется влиянием как атома комплекссообразователя, так и входящего в их состав лиганда, что наглядно было показано при изучении новых диоксиматов Co(III) [10]. Этот факт свидетельствует о том, что комплексные соединения нельзя рассматривать только как обычные компоненты питательной среды, которые поставляют продуценту углерод, водород, азот и необходимые ему микроэлементы. Очевидно, механизм их воздействия значительно сложнее и определяется особенностями их молекулярного строения.

Известно, что ферментные белки, секретируемые в культуральную жидкость, принимают свойственную им конфигурацию уже после завершения секреции, находясь на наружной поверхности цитоплазматической мембраны [14].

Учитывая сложность строения комплексных соединений, а также высокую избирательность клеточных мембран, затрудняющую их проникновение внутрь клетки, вероятно, именно здесь происходит взаимодействие комплексных соединений с ферментными белками. В зависимости от состава и структуры комплексные соединения могут или содействовать в формировании функционально активных молекул фермента, или нарушать этот процесс, оказывая ингибирующий эффект.

По результатам первичного скрининга в качестве возможных стимуляторов биосинтеза липаз штаммом *Aspergillus niger* CNMN FD 01L были отобраны три вещества:  $[\text{Co}(\text{MgH})_2 \cdot \text{Py}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Co} \cdot \text{Digsemi} \cdot \text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeO}_3 \cdot \text{Met}$ .

Поскольку возникновение стимулирующего эффекта определяется не только составом комплексного соединения, но и его концентрацией, вещества вносились в питательную среду в расширенном диапазоне концентраций (от 5 до 30 мг/л) для выявления наиболее оптимальной.

Согласно полученным результатам (табл.1), комплексное соединение  $[\text{Co}(\text{MgH})_2 \cdot \text{Py}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  подтвердило свой стимулирующий эффект, в отличие от двух других ( $\text{Co} \cdot \text{Digsemi} \cdot \text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeO}_3 \cdot \text{Met}$ ), которые не дали положительных результатов.

Оптимальное воздействие комплексного соединения  $[\text{Co}(\text{Mg})_2 \cdot \text{Py}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  наблюдается при концентрации 15 мг/л.



Таблица 1

**Изменение липолитической активности микромицета  
*Aspergillus niger* CNMN FD 01L под влиянием  
комплексных соединений кобальта и железа**

Комплексное соединение	Концентрация, мг/л	Активность	
		ед/мл	%
[Co(MgH) <sub>2</sub> ·Py <sub>2</sub> ]·BF <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	5	11250	92,79
	10	12375	102,07
	15	15750	129,9
	20	12375	102,07
	30	11250	92,79
Co-Digsemi·Cl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	5	13567	111,9
	10	11882	98,0
	15	11250	92,79
	20	10125	83,51
	30	5625	46,39
FeO <sub>3</sub> ·Met	5	12375	102,07
	10	11250	92,79
	15	10125	83,51
	20	9000	74,23
	30	5625	46,39
Контроль	-	12124	100,0

Липолитическая активность штамма при использовании этой концентрации составила 15750 ед/мл, а в контрольном варианте (без использования комплексного соединения) – 12124 ед/мл, что свидетельствует о повышении липолитической активности на 29,9 %.

В дальнейшем было изучено изменение липолитической активности микромицета при глубинном выращивании на контрольных и оптимизированных вариантах сред в зависимости от продолжительности культивирования. В оптимизированные варианты сред, кроме основных компонентов – KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и соевой муки, вносилось комплексное соединение [Co(MgH)<sub>2</sub>·Py<sub>2</sub>]·BF<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O в подобранной оптимальной концентрации – 15 мг/л. Динамика липолитической активности в культуральной жидкости продуцента определялась в течение 6 суток.

Анализ полученных результатов (таблица 2) показывает, что стимулирующий эффект проявляется уже на вторые сутки культивирования продуцента и именно в этот период достигается его максимум – 49,9 %. Можно предположить, что внесение в среду комплексного соединения как бы ускоряет процесс образования функционально активных молекул липолитического фермента.

Таблица 2

**Динамика липолитической активности продуцента *Aspergillus niger* CNMN FD 01L при культивировании его на исходной среде (контроль) и на среде с 15 мг/л [Co(MgH)<sub>2</sub>·Py<sub>2</sub>]·BF<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (оптимизированный вариант)**

Сутки	Активность			
	ед/мл		%	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
2	375	562	100	149,9
3	3750	5250	100	140,0
4	9187	12549	100	136,6
5	12558	17041	100	135,7
6	2775	3937	100	141,9



Установлено также, что комплексное соединение не влияет на проявление максимума накопления липолитической активности, который наблюдается на 5 сутки культивирования продуцента, как в контрольных, так и в оптимизированных вариантах сред и составляет 12558 ед/мл и 17731 ед/мл, соответственно (рис. 1).

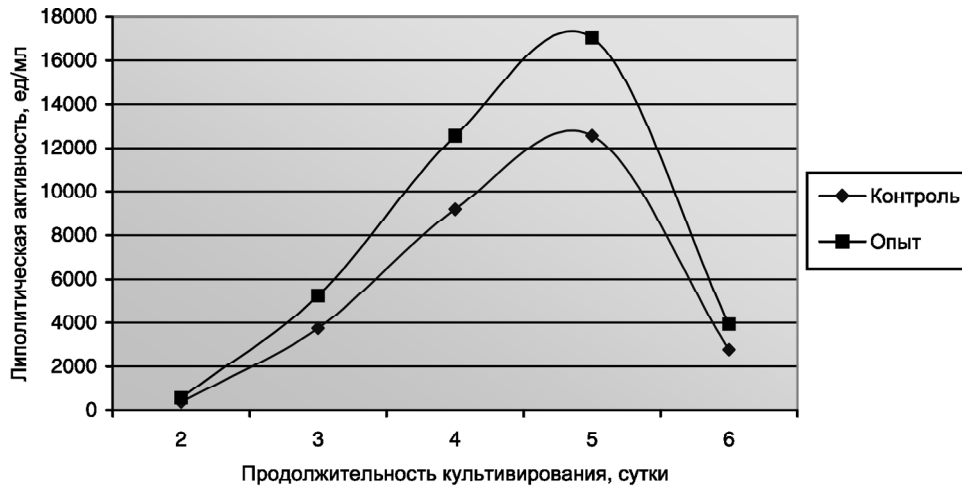


Рис. 1. Динамика липолитической активности продуцента *Aspergillus niger* CNMN FD 01L при культивировании его на исходной среде (контроль) и на среде с 15 мг/л  $[\text{Co}(\text{MgH})_2 \cdot \text{Pu}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (оптимизированный вариант)

Анализируя динамику накопления липаз в культуральных жидкостях, можно отметить снижение величины стимулирующего эффекта в стационарной фазе (4 — 5 сутки) с 49,9 % (2-е сутки) до 36,9 — 35,7 %. Этот факт можно объяснить тем, что стационарная фаза и без использования комплексных соединений характеризуется интенсивным накоплением целевых продуктов с высоким уровнем активности.

В подобранных условиях получен ферментный препарат с липолитической активностью 700000-800000 ед/г, оптимум активности при температуре 40 °С и pH 7,0.

Для рационального использования микробных липаз необходимо учитывать специфичность фермента к типу гидролизуемых связей [15]. Штамм *Aspergillus niger* CNMN FD 01L синтезирует неспецифические липазы, гидролизующие все эфирные связи триглицеридов независимо от их положения. Такие липазы эффективны для использования в биотехнологических процессах, связанных с получением чистого глицерина и жирных кислот.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты. — М.: Мир, 1978, — 396 с.
2. Давранов К. Микробные липазы в биотехнологии (обзор) // Прикл. биох. и микр. — Т. 30, вып. 4-5, 1994. — С. 527-534.
3. Безбородов А.М. Ферментативные реакции в биотехнологии // Прикл.



биох. и микр.— 1992, Т. 28, № 6.— С. 801-817.

4. Дарванов Л.Д., Халамейзер В.Б., Вагина О.Н. Синтетазная активность липазы *Penicillium* sp. в водной среде и системе обращенных мицелл // Прикл. биох. и микр., — 1996, Т. 32, №4. — С. 386-388.

5. Безбородов А.М. Биотехнология продуктов микробного синтеза.— М.: Агропромиздат, 1991. — 238 с.

6. Рубан Е.А. Ферменты микроорганизмов и их практическое использование. — М.: Изд-во МГУ, 1976. — С. 3-42.

7. Прист Ф. Внеклеточные ферменты микроорганизмов. — М.: Мир, 1987. — 117 с.

8. Парпиев Н.А., Кушакбаев А., Азимов М.М. Координационные соединения металлов с лекарственными препаратами. — Ташкент: ФАН, 1982. — 138 с.

9. Rudic V. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. Chisinau: Stiinta, 1993, 140 p.

10. Десятник А.А., Сырбу Т.Ф., Корочану Э.Б., Тюрина Ж.П., Лаблюк С.В. Увеличение липолитической активности штамма *Aspergillus niger* CNMN FD 01L под влиянием координационных соединений // Изв. АНМ биол. хим. и сел-хоз. науки. — 2003. — №2 (291). — С. 112-117.

11. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов.— М.: Легкая и пищ. пром., 1980. — С.75-76.

12. Рубан Е.А. Микробные липазы и липиды. — М.: Наука, 1977. — С. 216.

13. Deseatnic A., Sorbu T., Tiurin J., Labliuc S. Tulpina de fungi *Aspergillus niger* CNMN FD 01L - producatoare de enzime lipolitice. Brevet de inventie № 2362 ВОПІ, №1, 2004, p 32.

14. Феоктистова Н.В., Знаменская И.В., Лещинская И.В. Влияние ионов металлов на синтез внеклеточных ферментов спорообразующими бактериями. — М.: «Высш. шк.», 1992. — № 2 (338). — С. 19-24. — (Сер.: Биол. науки).

15. Давранов К.Д., Халамейзер, Розмухамедова Б.Х. Специфичность липаз мицелиальных грибов к типу сложноэфирных связей триглицеридов // Прикл. биох. и микр. — 1996. — Т. 32, № 3. — С. 294-297.

О. А. Десятник<sup>1</sup>, Ж.П. Тюрина<sup>1</sup>, С.В. Лаблюк<sup>1</sup>, О.А. Болога<sup>2</sup>, А.Г. Лазареску<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт мікробіології і біотехнології АНМ, вул. Академічна, 1, МД-2028, Кишинів, Молдова, тел: (373 22)725754, e-mail: cnmmoldova@yahoo.com

<sup>2</sup> Институт хімії АНМ, вул. Академічна, 1, Кишинів, Молдова

## ОСОБЛИВОСТІ БИОСИНТЕЗУ ЛІПАЗ ШТАМОМ *ASPERGILLUS NIGER* CNMN FD 01L НА СЕРЕДОВИЩАХ ОПТИМАЛЬНОГО СКЛАДУ

### Реферат

Наведені відомості по використанню комплексних сполук (КС) мікроелементів для регуляції біосинтезу мікробних ліпаз. Об'єктом біологічних досліджень слугував мікроміцет *Aspergillus niger* CNMN FD 01L, відібраний як перспективний продуцент позаклітинних ферментів, що мають ліполітичну дію. Штам *Aspergillus niger* CNMN FD 01L синтезує неспецифічні ліпази, що гідролізують усі ефірні зв'язки тригліцерину незалежно від їхнього положення.

Щодо підвищення ензиматичної активності штаму, було протестовано близько 60-ти комплексних сполук Co, Fe, Ni, Cu, Zn, які містять



у складі лігандів піридин, аналан, тіокарбамід, метил-та диметилглі-  
оксим, амінокислоти (метіонін, гліцин, валін).

За результатами первинного скринінгу три речовини:  $[\text{Co}(\text{MgH})_2\cdot\text{Py}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Co} \cdot \text{Digsemi} \cdot \text{Cl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeO}_3 \cdot \text{Met}$  було відібрано як стимулятори біосинтезу ліпаз у штаму *Aspergillus niger* CNMN FD 01L. Максимальний ефект зареєстровано у варіанті з використанням комплексної сполуки  $[\text{Co}(\text{MgH})_2\cdot\text{Py}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  у концентрації 15 мг/л. Встановлено, що використання комплексної сполуки не впливає на виявлення максимуму накопичення ліполітичної активності, який спостерігається на 5-у добу культивування продуцента, як у контрольному, так і в оптимізованому варіантах середовищ і складає 1258 од/мл та 17731 од/мл, відповідно.

К л ю ч о в і с л о в а: ліпази, *Aspergillus niger*, комплексні сполуки кобальта і заліза, стимулятори біосинтезу.

**A.A. Desyatnic<sup>1</sup>, J.P. Tiurina<sup>1</sup>, S.V. Labliuc<sup>1</sup>, O.A. Bologa<sup>2</sup>, A.G. Lazarescu<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Microbiology and Biotechnology of ASM, Academichna str.,1, md 20-28, Chisinau, Moldova.

<sup>2</sup>Institute of Chemistry of ASM, Academichna str.,1, md 20-28, Chisinau, Moldova.

## THE PECULIARITIES OF THE LIPASES BIOSYNTHESIS BY *ASPERGILLUS NIGER* CNMN FD 01L STRAIN ON THE MEDIA WITH OPTIMAL COMPOSITION

### Summary

The article contains data referring to the using of coordinative compounds of microelements for the regulation of the biosynthesis of microbial lipases. As the object of biological investigations *Aspergillus niger* CNMN FD 01L strain, selected as perspective producer of exocellular enzymes with lipolytic action was used. *Aspergillus niger* CNMN FD 01L strain synthesize unspecific lipases, which hydrolyse all the ester binding of triglyceride independent of their location.

For increasing of enzymatic activity of the strain there were studied about 60 coordinative compounds of Co, Fe, Ni, Cu, Zn and other, containing in ligands composition pyridine, aniline, thiocarbamid, metil- and dimetilglioxime, amino acids (methionin, glicin, valin) etc.

In the result on the first screening three substances:  $[\text{Co}(\text{MgH})_2\cdot\text{Py}_2]\cdot\text{BF}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Co}\cdot\text{Digsemi}\cdot\text{Cl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeO}_3\cdot\text{Met}$  have been selected as possible stimulators of the lipases biosynthesis by *Aspergillus niger* CNMN FD 01L strain.

Maximum effect was registered in the variant with the coordinative compound:  $[\text{Co}(\text{MgH})_2\cdot\text{Py}_2]\cdot\text{BF}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  in concentration 15 mg/l.

Also, it was established the using of coordinative compounds has not influenced the maximum of lipases accumulation, which is shown at the 5th day of producer cultivation on the control medium (without coordinative compound) as well as on the optimized medium, being 12558 u/ml and 17731 u/ml, respectively.

К e y w o r d s: lypazes, *Aspergillus niger*, combinations of cobalt and iron, stimulators of biosynthesis.

