

УДК 547.458.65

ИНУЛИНАЗА ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES-CEREVISIAE* ВГШ-2. ПРЕПАРАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Рутковская Т.Р., Шуваева Г.П., Корнеева О.С.

ГОУ ВПО «Воронежская государственная технологическая академия», Воронеж
post@vgta.vrn.ru

Представлены результаты по биосинтезу продуцента эндо-инулиназы, выделению и очистке фермента. С применением полного факторного эксперимента оптимизированы условия биосинтеза фермента под влиянием исследуемых факторов. Получен гомогенный препарат инулиназы с высокой степенью очистки. Определены оптимальные параметры каталитической активности фермента.

Ключевые слова: эндо-инулаза, продуценты, инулин, фермент, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* ВГШ-2.

Введение

Актуальной задачей биотехнологии является получение пребиотиков – веществ для поддержания нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта. К таким веществам относятся различные фруктозиды. Доказано, что инулин и олигофруктозиды избирательно стимулируют рост и метаболическую активность бифидо- и лактобактерий, не влияя на рост других бактерий и подавляя рост потенциально патогенных бактерий [1, 2, 3]. Одним из способов получения фруктоолигосахаридов является ферментативный гидролиз инулинсодержащего сырья. Несмотря на многочисленные исследования инулиназ – ферментов, гидролизующих инулин, данные по получению эндо-инулиназ немногочисленны [4, 5, 6]. Отсутствуют высокоактивные ферментные препараты, способствующие превращению инулинсодержащего сырья во

фруктозиды различной степени полимеризации.

Целью работы явилось определение оптимальных условий биосинтеза дрожжей – продуцента активной эндо-инулиназы, получение высокоочищенного препарата фермента и изучение его физико-химических свойств.

Материалы и методы

Объектом исследования служили селекционированные авторами дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* ВГШ-2, обладающие способностью к интенсивному биосинтезу эндо-инулазы [7]. Дрожжи культивировали жидкофазным способом на несменяемой среде (частота вращения 4с^{-1} , уровень аэрации $1,4\text{ г O}_2/\text{дм}^3$; температура $32-34^\circ\text{C}$; pH 4,8; объем питательной среды 100 см^3). По окончании выращивания (24 ч) дрожжи отделяли центрифугированием при 8000 об/мин

в течение 15 мин, промывали водой, отпрессовывали до влажности 75 %.

Извлечение фермента осуществляли путем разрушения клеток дрожжей с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т при мощности 500 Вт и частоте 22 кГц в течение 2-х мин в ледяной бане. Гомогенат использовали для получения водной вытяжки (10 %) путем настаивания в течение 20 мин при $(20 \pm 2^\circ\text{C})$ и центрифугирования при 8000 об/мин в течение 10 мин. *Saccharomyces cerevisiae* охлаждали до $2-4^\circ\text{C}$ и проводили очистку ферментного препарата.

Для получения высокоочищенного препарата инулиназу осаждали из водной вытяжки изопропиловым спиртом в соотношении объемов 1:1,5 при температуре смеси $2-4^\circ\text{C}$. Осадок, содержащий фермент, отделяли центрифугированием в течение 10 мин. Осажденный фермент растворяли в 0,1 М ацетатном буфере, рН 4,5, наносили на колонку размером 21,5×150 мм и элюировали тем же буфером со скоростью 1 мл за 5 мин. В ходе очистки инулиназы применяли сефадекс G-25 (для освобождения фермента от низкомолекулярных примесей и разделения с близкими по размерам белковыми молекулами). Далее проводили гель-фильтрацию на колонке с сефадексом G-100. Содержание белка во фракциях определяли по методу Лоури.

Активность инулиназы определяли резорциновым методом по реакции Селиванова, используя в качестве субстрата инулин (Spofa, Прага).

Для выращивания дрожжей *S. cerevisiae* использовали синтетическую среду Ридера с глюкозой в качестве источника углерода (среда №1), пивное сусло (среда №2), дрожжевую питательную среду следующего состава (%): пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; глюкоза – 2; рН среды от 5,5 до 8,0 (среда № 3).

Обсуждение результатов

Известно, что в дрожжевой клетке β -фруктофуранозидаза прочно с ней связана и переходит в водные экстракты в незначительных количествах. Это подтверждают и наши исследования, как в отношении инвертазы, так и инулиназы. Культивирование дрожжей проводили на питательной среде № 2. Об активности ферментов судили по накоплению редуцирующих веществ. При изучении способности внутри- и внеклеточных гликозидаз дрожжей *S. cerevisiae* гидролизовать 5 % раствор сахарозы и инулина (рис. 1) было установлено, что наибольшая активность ферментов (95–97 %) сосредоточена внутри клетки, поэтому дальнейшие исследования проводили с внутриклеточными ферментами.

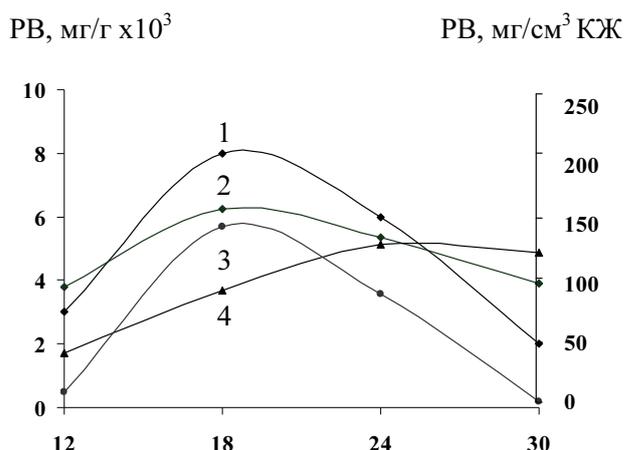


Рис. 1. Гидролиз сахарозы (PB, мг) внутриклеточными (1,2) и внеклеточными (3,4) гликозидазами *S.cerevisiae* ВГШ-2. 1,3 – инулиназа; 2,4 – инвертаза

Использование питательных сред разного состава для биосинтеза гликозидаз показало (рис. 2), что наибольшая активность β -фруктофуранозидазы и инулиназы (640 и 110 ед/г биомассы, соответственно) наблюдалась при культивировании дрожжей в течение 24-х ч на среде № 2. Чтобы исключить влияние на биосинтез ферментов мальтозы, азотсодержащих и минеральных веществ, которые входят в состав пивного сусла в ко-

личестве (%): 58,95, 4,34 и 1,53 соответственно, дальнейшие исследования проводили на дрожжевой среде, активность инвертазы на которой составила 600 и инулиназы – 390 ед/г сырой биомассы дрожжей. Соотношение инвертаза/инулиназа составило 1,5 : 1,0.

Далее перед нами стояла задача – подобрать состав среды, обеспечивающий изменение соотношения в сторону увеличения синтеза инулиназы.

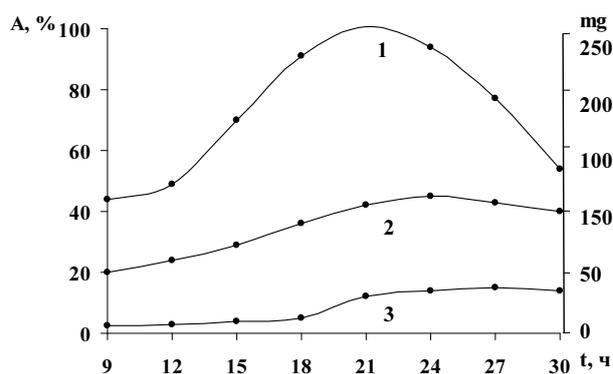


Рис. 2. Изменение активности инулиназы, синтезируемой *Saccharomyces cerevisiae* ВГШ-2 при культивировании на различных питательных средах. А – активность инулиназы; t – продолжительность культивирования, ч; 1 – пивное сусло; 2 – дрожжевая среда; 3 – синтетическая среда Ридера

Для определения влияния различных углеводов на рост дрожжей *S. cerevisiae* ВГШ-2 и синтез ими инулиназы в питательную среду поочередно включали моносахариды, олигосахариды и полисахариды. Углеводы вносили в количестве 1 % по углероду в питательную среду, содержащую 1,0 % масс. пептона и 0,5 % масс. дрожжевого экстракта, pH 4,5–6,0. Результаты исследований представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние источника углерода на биосинтез инулиназы дрожжей *S. cerevisiae* ВГШ-2

Источник углерода	Активность инулиназы ед/г дрожжей	Количество дрожжевых клеток в 1 см ³ питательной среды
Глюкоза - контроль	500	870
Фруктоза	980	995
Рамноза	20	100
Инулин	760	1095
Арабиноза	20	135
Сахароза	850	1060
Лактоза	30	400
Мальтоза	210	727
Раффиноза	230	560
Крахмал	70	680
Галактоза	110	430

Из табл. 1 следует, что все источники углерода по способности к биосинтезу инулиназы можно расположить в следующий нисходящий ряд: фруктоза→сахароза→инулин→глюкоза→раффиноза→мальтоза→галактоза→крахмал→лактоза→арабиноза→рамноза. Количество образующейся биомассы на средах с различными источниками углерода также было различным. Наибольшее накопление дрожжевых клеток наблюдалось при выращивании их на среде с инулином, сахарозой, фруктозой и глюкозой. Однако строгой корреляции между накоплением клеток в культуре дрожжей и биосинтезом фермента установлено не было.

Наряду с углеродом в процессе биосинтеза ферментов большое значение имеют также источники азота. Для выявления наилучших источников азота при биосинтезе инулиназы *S. cerevisiae* ВГШ-2 нами были испытаны минеральные соли: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, NH_4Cl , NaNO_3 , KNO_3 и источники органического азота: кукурузный экстракт, солодовый экстракт, дрожжевой экстракт. Их дозировали в количестве 0,086 % по азоту. Влияние источников углерода исследовали на фоне фруктозы, которую использовали в количестве 2,5 % к массе среды (табл. 2).

Таблица 2

Влияние источника азота на биосинтез инулиназы дрожжей *S. cerevisiae* ВГШ-2

Источник азота	Активность инулиназы, % от максимальной	Количество дрожжевых клеток в 1 см ³ питательной среды (x 10 ³)
KNO ₃	68	14,5
NaNO ₃	24	11,2
NH ₄ NO ₃	34	12,1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	57	10,1
NH ₄ H ₂ PO ₄	100	10,3
(NH ₄) ₂ SO ₄	47	18,4
Дрожжевой экстракт	60	20,9
Кукурузный экстракт	36	17,69
Солодовый экстракт	18	8,965

Из табл. 2 видно, что лучшим из минеральных солей оказался NH₄H₂PO₄; среди источников органического азота – дрожжевой экстракт. Интенсивный синтез фермента в присутствии аммонийных солей фосфорной кислоты можно объяснить тем, что они являются как источником азота, так и источником фосфора. Последний, как известно, играет важную роль в биоэнергетике клетки.

С целью оптимизации условий биосинтеза инулиназы в качестве основных

факторов, влияющих на биосинтез инулиназы дрожжей *S. cerevisiae*, были выбраны: x₁ – температура культивирования, °С; x₂ – продолжительность процесса культивирования, ч; x₃ – исходная величина рН питательной среды; x₄ – концентрация NH₄H₂PO₄, %; x₅ – концентрация фруктозы, %. Все эти факторы не совместимы и не коррелируют между собой. Пределы изменения этих факторов приведены в таблице 3.

Таблица 3

Пределы изменения факторов при биосинтезе инулазы дрожжей *S. cerevisiae* ВГШ-2

Условия планирования	Факторы				
	x ₁ , °С	x ₂ , ч	x ₃	x ₄ , %	x ₅ , %
Основной уровень (0)	35	24	4,5	0,6	2,5
Интервал варьирования Δ	5	6	0,5	0,2	0,5
Верхний уровень (+1)	40	30	5,0	0,8	5,0
Нижний уровень (-1)	30	18	6,0	0,4	2,0
Верхняя «звездная точка» (+2)	45	36	5,5	1,0	3,5
Нижняя «звездная точка» (-2)	25	12	3,5	0,2	1,5

Критерием оценки влияния различных факторов на биосинтез инулиназы была активность фермента, содержащегося в клетках дрожжевой биомассы (Y, ед/г биомассы).

Программа исследований закладывалась в матрицу планирования экспериментов. В исследованиях использовали полный факторный эксперимент 2⁵ с

применением центрального композиционного рототабельного униформпланирования. Порядок опытов рандомизировали посредством таблицы случайных чисел, что исключало влияние неконтролируемых параметров на результаты эксперимента.

Статистическая обработка экспериментальных данных позволила получить уравнение регрессии (1), описывающее процесс биосинтеза инулиназы под влиянием исследуемых факторов ед/см³:

$$Y = 990,058 - 206,408 x_1 + 190,651 x_2 + 216,308 x_3 + 90,986 x_4 - 102,384 x_5 - 207,082 x_1 x_2 - 147,438 x_1 x_3 - 51,188 x_1 x_4 + 92,688 x_1 x_5 + 111,063 x_2 x_3 + 183,312 x_2 x_4 + 127,688 x_2 x_5 + 74,468 x_3 x_4 - 82,988 x_2 x_5 - 75,238 x_4 x_5 - 157,803 x_1^2 + 1,197 x_2^2 + 20,928 x_3^2 - 145,053 x_4^2 - 170,053 x_5^2. (1)$$

Анализ полученных данных позволил выделить факторы, оказывающие наибольшее влияние на процесс биосинтеза инулиназы дрожжами *S.cerevisiae* ВГШ-2, это – температура и продолжительность культивирования. В меньшей степени влияли концентрация фруктозы и гидрофасфа-

та аммония. Отношение коэффициентов перед линейными членами, показывающее степень влияния факторов друг на друга, оказались равными $x_2/x_1 = -0,899$; $x_3/x_1 = -0,763$; $x_4/x_1 = -0,347$; $x_5/x_1 = -0,477$; $x_3/x_2 = 0,098$; $x_4/x_2 = 0,399$; $x_5/x_2 = 0,388$; $x_4/x_3 = 0,216$; $x_5/x_3 = -0,383$; $x_5/x_4 = -0,496$.

Таким образом, уравнение (1) позволило получить информацию о влиянии факторов и их взаимодействии на биосинтез инулиназы. Данный подход позволил выбрать оптимальные условия, обеспечивающие максимальный биосинтез инулиназы: температура культивирования $x_1 = 30^0$ С, продолжительность биосинтеза $x_2 = 30$ ч, начальное значение рН среды $x_3 = 5,0$, концентрация $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ $x_4 = 0,8$ %, концентрация фруктозы $x_5 = 3$ %. В этом случае активность инулиназы составила $Y = 1998,2$ ед/г дрожжей.

Изучение физико-химических свойств ферментов требует их высокой степени очистки. Результаты по очистке представлены в таблице 4. В результате очистки был получен ферментный препарат со степенью очистки 88,9 и удельной активностью 378,75 ед/г белка.

Таблица 4

Очистка инулиназы *S. cerevisiae* ВГШ-2

Стадии очистки	Активность инулиназы, ед	Количество белка, мг	Удельная активность, ед/мг белка	Степень очистки	Выход, %
Водная вытяжка дрожжей	4417,0	738,0	5,98	1,00	100
Осаждение изопропанолом в соотношении объемов 1:1,5	2517,7	243,2	10,35	1,73	95
Гель-фильтрация на сефадексе G-50	1104,3	11,69	93,46	15,62	87
Гель-фильтрация на сефадексе G-100	60,6	0,16	378,75	63,33	75

Эксперименты по исследованию влияния температуры и рН на каталитическую активность инулиназы (рис. 3) показали, что температурный оптимум действия

фермента лежит в пределах 43-46°C. Кривая рН-активности имеет характерную для многих ферментов колоколообразную форму с максимумом 4,5-4,7.

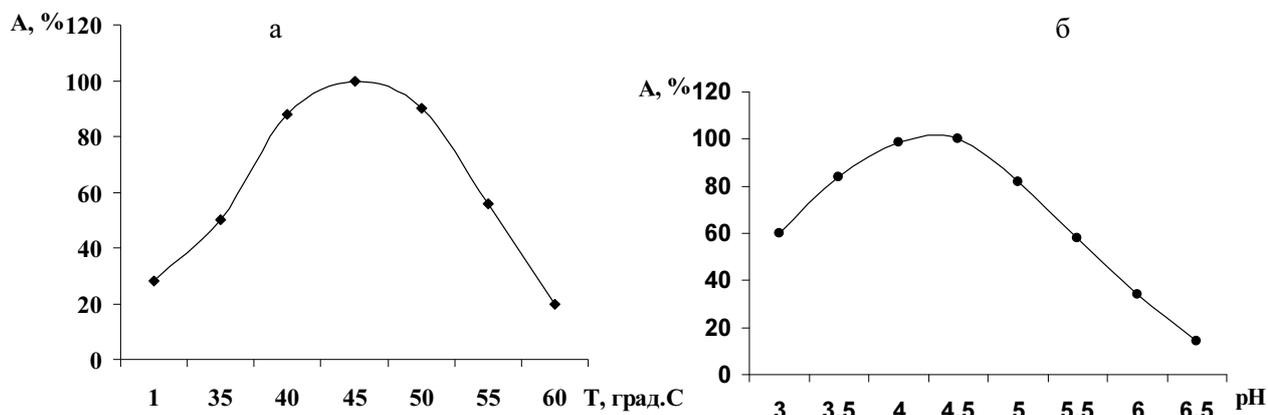


Рис. 3. Влияние температуры (а) и рН (б) на каталитическую активность инулиназы дрожжей *S.cerevisiae*

Выводы

1. Исследование локализации фермента в дрожжевой клетке показало, что дрожжи *S.cerevisiae* ВГШ-2 синтезируют внутриклеточную инулиназу.

2. Исследования по влиянию различных углеводов на биосинтез инулиназы показали, что она относится к индуцибельным ферментам. Индуцирование синтеза фермента происходит под действием фруктозы, сахарозы и инулина. Относительно низкий уровень активности на среде с глюкозой косвенно свидетельствует о том, что глюкоза, вероятно, является катаболитным ингибитором.

3. Методом статистической обработки экспериментальных данных были подобраны оптимальные параметры процесса

культивирования дрожжей, обеспечивающие максимальный синтез инулиназы: состав питательной среды (%): дрожжевой экстракт – 2; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 0,8, фруктоза – 3; начальное значение рН среды 5,0; температура культивирования 30°C, продолжительность 30 ч.

4. Оптимальными параметрами каталитической активности инулиназы следует считать: рН 4,5-4,7; температуру 45-47°C; концентрацию субстрата 5×10^{-7} моль/л.

Список литературы

1. Menne E., Guggenbuhl N., Roberfroid M. Fn-type chicory inulin hydrolysate has a prebiotic effect in humans. // J. Nutr. 2000. № 130 P. 1197-1199.
2. Delzenne N.M., Kok N. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. // Am J Clin Nutr. 2001 № 73 P. 456-458.

3. Grizard D., Barthomeuf C. Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. // *Reprod. Nutr. Dev.* 1999. 39 P. 563-588.
4. Kulminskaya A.A., Arand M., Eney-skaya E.V., Ivanen D.R., Shabalin K.A., Shish-lyannikov S.M., Saveliev A.N., Korneeva O.S., Neustroev K.N. Biochemical characterization of *Aspergillus awamori* exoinulinase: substrate binding characteristics and regioselectivity of hydrolysis. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1650 P. 22-29.
5. Pandey A., Soccol C.R., Selvakumar P., Soccol V.T., Krieger N., Fontana J.D. Recent developments in microbial inulinases. Its production, properties, and industrial applications.// *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1999. № 81. P. 35-52.
6. Baumgartner S., Praznik W. Purification of exo- and endoinulinase from crude inulinase extract for the analysis of fructans.// *Int. J. Biol. Macromol.* 1995, № 17 P. 247-250.

INULINASE YEAST SACHAROMYCES-CEREVISIAE VGH-2. PRODUCTION AND SOME PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

Rutkovsky T.R., Shuvaeva G.P., Korneyev O.S.

*The Voronezh state technological academy, Voronezh
post@vgta.vrn.ru*

Results on producer biosynthesis endo-inulinase are presented, to allocation and enzyme clearing. With application of full factorial experiment conditions of biosynthesis of enzyme under the influence of investigated factors are optimised. The homogeneous preparation inulinase with high degree of clearing is received. Optimum parameters activity of enzyme are defined.

Keywords: endo-inulaza, producers, inulin, enzyme, yeast, Saccharomyces cerevisiae VGH-2.