

УДК 663.15

Л.О. Пескова, Н.В. Дехтяренко

ФЕРМЕНТ ЛІПАЗА: АНАЛІЗ ГАЛУЗЕЙ ВИКОРИСТАННЯ, ПРОДУЦЕНТІВ, СПОСОБІВ ОДЕРЖАННЯ

The analysis and synthesis of information on the field of use, sources, mechanism of action and properties of the enzyme lipase was performed in a review. It is established that for sectors of the economy in which lipase successfully used or is planned to be used is constantly expanding. Performed patent search of lipase modern producers has found among these bacteria, actinomycetes, yeast and microscopic fungi. The features of the formation process of culture media and cultivation of lipase producers profound way. Detailed description of modern technologies lipases with varying degrees of treatment D2x, D3x, D10x is presented. It is established, that for obtaining of highly purified enzyme preparations of lipases fractionation using ion exchange and gel-filtration is used the most often. The latest alternative methods of treatment are described. Modern methods of immobilization of lipases are presented. It is shown that the physical adsorption immobilization methods are used, among chemical – method of covalent binding of the enzyme with the carrier. The possibility of immobilization of enzymes on the surface of yeast cells was outlined. Methods of determining the target of the activity of lipase, which include alkalimetric titration and colorimetric method were established. Range of manufacturers of lipolytic enzymes, which are focused today outside the commonwealth of independent states was outlined.

Keywords: lipase, an enzyme hydrolysis, substrate, fats, sectors of the economy, a producer, activity, sources of nitrogen, inductors biosynthesis, soy flour, the degree of purification, fractionation, chromatography, adsorption, immobilization.

Вступ

Основну частину промислово важливих ферментів світового ринку на сьогодні становлять гідролази. Ліпази (триацилгліцеролгідролази КФ 3.1.1.3) як гідролітичні ферменти можуть використовуватись у багатьох галузях господарства, де необхідний частковий або повний гідроліз жирів та олій. Вони широко застосовуються в харчовій, фармацевтичній та легкій промисловості, в медицині, в препаративній хімії та біохімії, у виробництві мийних засобів, для очищення стічних вод і каналізаційних комунікацій.

Ліпази викликають великий інтерес у науковців у зв'язку зі своїми унікальними властивостями, а саме дією на поверхні поділу фаз, різноманітністю субстратної специфічності, здатністю каталізувати як гідроліз тригліцеридів, так і зворотні реакції в мікродводневих умовах [1].

Ліполітичні ферменти поширені в організмах різного рівня біологічної організації, але вирішити технологічні завдання можна тільки за допомогою їх мікробного синтезу [2]. Науковці різних країн працюють з широким колом мікробних продуцентів, підбираючи для кожного умови культивування, виділення й очистки.

На сьогодні в Україні промислове виробництво ферментів ліполітичного комплексу не налагоджено. Стримуючим фактором у виробництві ліпаз є відсутність стабільних високоак-

тивних промислово цінних продуцентів з новими властивостями, необхідними для тієї чи іншої галузі [3].

Постановка задачі

Метою роботи є аналіз і узагальнення інформації щодо галузей використання, джерел одержання, механізму дії та властивостей ферменту ліпази, опис сучасних технологій отримання ліпаз різного ступеня очистки, методів іммобілізації ферменту, способів визначення цільової активності й окреслення кола виробників ліполітичних ферментних препаратів.

Галузі використання ліпаз

Застосування ліпаз набуло широкого поширення, і на сьогодні можна виокремити не менше десяти галузей народного господарства, де ці ферменти – тваринного або мікробного походження – використовуються досить успішно: 1) харчова промисловість – сироваріння, виробництво хліба, круп'яних і макаронних виробів, кондитерська промисловість (виробництво молочного шоколаду, гідроліз залишкового жиру в сухому яєчному білку), приготування безалкогольних напоїв, виробництво рослинних олій, отримання дієтичних жирових продуктів; 2) легка промисловість – обробка хутра та шкіри, виробництво шовку; 3) побутова хімія – виробництво мийних засобів; 4) ме-

дицина – на сьогодні як терапевтичні засоби використовують ліпази тваринного походження, одержані з підшлункової залози; 5) очищення стічних вод і каналізаційних комунікацій, утилізація відходів масложирової промисловості; 6) препаративна хімія та біохімія – ліпази каталізують процеси трансетерифікації жирів (ацидоліз), алкоголіз, інтеретерифікацію, використовуються для розділення рацемічних сумішей спиртів і карбонових кислот за допомогою асиметричного гідролізу відповідних складних ефірів); 7) косметична промисловість; 8) сільське господарство – для приготування легкозасвоюваних кормів і для поліпшення обміну речовин у тварин; 9) використання іммобілізованих ліпаз при виробництві гліцерину, жирних кислот, моно- та дигліцеридів, у жиропереробці (ензимна переетерифікація); 10) отримання біодизелю ліпазним каталізмом [2, 4–10].

Продукти ліпаз

Найперспективнішим джерелом ліпаз є мікроорганізми [8]. Перевагами мікробіологічного синтезу ліполітичних ферментів є висока швидкість росту, потужний ферментний апарат, можливості проводити генетичні маніпулювання з мікроорганізмами [3].

Активні продуценти ліпаз виявлено серед бактерій родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Propionibacterium*, *Chromobacterium*, *Serratia*, *Geobacillus*; актиноміцетів – *Streptomyces flavogriseus*, *Thermoactinomyces vulgaris*.

За літературними даними, ефективними продуцентами ліпази є дріжджові культури родів *Candida* (*Candida lipolytica*, *Candida paralipolytica*, *Candida cylindraceae*), *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulospora*, *Trichosporon*. Сучасна патентна література описує рекомбінантні дріжджові штами. Так, штам *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3323 здатний синтезувати ліпазу з ліполітичною активністю (ЛА) до 9000 од./мл культуральної рідини і може бути використаний у харчовій промисловості, побутовій хімії та косметичці [11], *Yarrowia lipolytica* ВКПМ Y-3600 дає змогу отримати ЛА до 2700 од./г сухої ваги і може бути використаний для ферментації в промислових масштабах [12].

Високою ЛА характеризуються мікроскопічні гриби родів: *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Oospora*, *Ophiostoma*, *Humicola*, *Ashbya*, *Beauveria*, *Rhizomucor*, *Fusarium*, *Acromonium*, *Alternaria*, *Eurotrium* [3, 13, 14].

Бактерії, як правило, накопичують внутрішньоклітинну ліпазу, а актиноміцети, гриби та дріжджі – переважно позаклітинну. Використання бактерій – продуцентів ліпаз порівняно з грибами має важливу перевагу, що полягає у прискоренні процесу культивування [8].

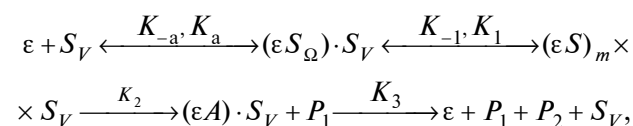
Механізм дії ліпаз

Ліпаза (триацилгліцєролацилгідроліза, стеапсин) – водорозчинний фермент – естераза (КФ 3.1.1.3), що каталізує гідроліз нерозчинних естерів – ліпідних субстратів, допомагає перетравлювати, розчиняти і фракціонувати жири.

Фермент здійснює гідролітичне розщеплення триацилгліцєролів до диацилгліцєролу і залишку жирної кислоти. Потім проходить відщеплення наступних залишків жирних кислот до утворення гліцерину. При цьому швидкість відщеплення кислотного залишку від триацилгліцєролів у кілька разів вища, ніж від ди- і тим більше від моноацилгліцєрола.

Ферментативний гідроліз ліпідів має істотну відмінність від інших ферментативних реакцій. Це гетерогенний процес, оскільки переважна більшість ліпаз розчинні у воді, а субстратні молекули – нерозчинні й об'єднані в малорухомі великі асоціати (міцели, емульговані жири краплі). Отже, фермент-субстратна взаємодія повинна протікати на поверхні поділу фаз. Вважається, що в силу нерозчинності субстрату взаємодія з активним центром мала би бути ускладнена, однак експериментальні дані показують, що молекулярна активність ліполітичних ферментів не нижча, ніж у інших гідроліз, що діють на водорозчинні субстрати. Встановлено, що чим вищий ступінь диспергування субстрату, тим швидше відбувається ліполіз [2, 8, 15].

Реакція ліполізу може бути подана такою схемою [8]:



де ε – фермент; S_V – субстрат у ліпідній фазі; K_a і K_{-a} – константи адсорбції і десорбції; K_1 і K_{-1} – константи прямої і зворотної реакції при утворенні комплексу Міхаеліса; S_Ω – молекули субстрату, розміщені на межі поділу фаз; εS – активована ліпаза; εA – ацил-

фермент; P_1 і P_2 – продукти реакції; K_2 і K_3 – константи каталітичних стадій.

Властивості ліпаз

Ліпази залежно від джерела походження різняться за фізико-хімічними властивостями і, природно, далеко не ідентичні за своєю дією [4]. Для багатьох ліполітичних ферментів визначена субодинична структура [8]. Встановлено, що більшість ліполітичних ферментів діють як серинові гідролази з тріадою Ser-Gis-Asp в активному центрі. Кислотний залишок аспарагінової кислоти тріади в гідролітичних ферментах, які каталізують розщеплення складних ефірів, може бути замінений глутаміновим [2]. Ензими проявляють специфічність до оптичних ізомерів ефірів: позиційну (стереоспецифічність), гліцеридну та жирнокислотну [16].

Культивування продуцентів ліпаз

Біосинтез ліпаз проводять на живильних середовищах, до складу яких обов'язково входять джерела вуглецю, азоту та індуктори біосинтезу [8].

Джерела вуглецю. Найчастіше у складі поживних середовищ використовують оливкову і бавовняну олії, рідше – соняшникову, рапсову, кукурудзяну, рицинову, трибутиринову, соєву, лляну олії. Є дані про те, що низка продуцентів збільшують біосинтез ліпаз за наявності не тільки олій, але й жирних кислот [2, 8, 16–19].

Джерела азоту. У складі середовищ використовують мінеральні, органічні та змішані джерела азоту. Дуже важливим компонентом середовища є соєве борошно, ліпідний комплекс якого стимулює біосинтез ліпаз багатьма мікроорганізмами. Для деяких продуцентів замість соєвого борошна або разом із ним використовують кукурудзяний екстракт, соєву макуху, пептон, казеїн, білково-вітамінний концентрат, дріжджовий автолізат (екстракт), кормові дріжджі, осадові пивні дріжджі, сульфат амонію, молочну сироватку, екстракти бавовняного і соняшникового шротів, кров'яне, м'ясо-кісткове, рибне борошно та інші компоненти [2, 16, 19].

Індуктори біосинтезу ліпази. Синтез ліполітичних ферментів мікроорганізмами, за деякими винятками, є індукційним, тому до складу середовищ дуже часто додають компоненти ліпідної природи. Для кожного продуцента необхідний вибір індуктора [20]. Встановлено, що

навіть ті мікроорганізми, які за наявності ліпідів підвищують біосинтетичну здатність, вельми чутливі до рівня ліпідів у середовищі. Багато вчених відзначають, що концентрація ліпідів у середовищі повинна становити не більше 10–50 % від кількості внесеного у середовище джерела вуглецю, що відповідає 5–20 г/л, оскільки підвищення концентрації ліпідів у середовищі часто призводить до значного зниження рівня біосинтезу ферменту. Мабуть, це пов'язано з тим, що продукти їх розщеплення, які накопичуються, починають пригнічувати процес біосинтезу ліпази [8].

До індукторів ліпідної природи належать триацилгліцероли, жирні кислоти (олеїнова), олії (оливкова, гірчична, соняшникова, бавовникова, льняна, рицинова) [2, 8, 20].

Пропонується використовувати як джерело вуглецю і стимулятор утворення ліпаз неіоногенні поверхнево-активні речовини (ПАР), до яких належать різні твіни, спани і жовчні кислоти (аніонні ПАР). Так, дослідження впливу різних ПАР на біосинтез ліпази *Rhizopus oryzae* 1403 проводили на фоні середовища із соєвою макухою (2 %), кукурудзяним екстрактом (1 %), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,5 %) і соняшnikовою олією (0,5 %). Результати показують, що полівініловий спирт і фосфатидний концентрат слабо впливають на біосинтез ліпази мікроміцетом. Негативну дію проявляли брідж 35 (поліоксietenлауриновий ефір) і брідж 58 (поліоксieten-20-цетиловий ефір). Тритони сильно різнилися за своїм ефектом. А при додаванні тритона X-305 вдалося підвищити активність ферменту в 3,25 разу [2].

Принципові схеми культивування продуцентів ліпази розкриті на прикладі сучасних дріжджових, бактеріальних і грибних продуцентів.

1. Штам *Yarrowia lipolytica* Y-3323 культивують при 30 °C протягом 3 діб на качалках зі швидкістю обертання 250 об./хв на середовищі YNB із додаванням глюкози (5 мас. %), оливкової олії (5 мас. %) і сечовини (0,8 мас. %). При ферментації штам Y-3323 синтезує ліпазу з активністю 9000 од./мл культуральної рідини [11].

2. Штам *Serratia marcescens* B-10 L-1 культивують на качалках зі струшуванням при 28–30 °C на середовищі, г/л: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; KH_2PO_4 – 3,0; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 7,0; NH_4Cl – 1,0; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; NaCl – 0,5; відвар соєвого борошна – 50,0. Через 10 год культивування в культуральній рідині накопичується

максимальна кількість ліпази зі специфічною активністю 800 од. акт./мг біомаси [17].

3. Штам *Rhizopus oryzae* 1403 культивують за температури 30–32 °С, при початковому рН 7,0, аерації протягом 48 год [2]. Потім у культуральне середовище додають тритон Х-305 у кількості 0,008–0,010 мас. % і продовжують культивування ще 24 год [19].

Виділення й очистка ліпаз

Виділення й очистка ліпаз – це трудомісткий і складний процес, тому в деяких випадках ферментні препарати використовують у неочищеному вигляді: у шкіряній і хутровій промисловості ступінь очистки не впливає на якість готової продукції, в той час як у харчовій промисловості, в мікробіологічних виробництвах і особливо в медицині можуть використовуватися тільки ферменти достатньо високого, інколи граничного ступеня очистки.

Отримання ферментних препаратів ліпаз із індексами Г2х, Г3х. Отримання препаратів ліпаз та їх очищення проводять на основі фільтратів культуральної рідини. Біомаса продуцента і тверда суспензія середовища відокремлюються центрифугуванням, фільтруванням або сепаруванням.

Наступний етап – концентрування ферментних розчинів, наприклад ультрафільтрацією або вакуум-випарюванням. Концентрований до 50 % сухих речовин фільтрат культуральної рідини стандартизують хлоридом натрію і направляють до споживача. Номенклатура цього препарату Г2х.

Отриманий концентрат може безпосередньо висушуватися для отримання технічних препаратів з індексом Г3х. Рідкі напівпродукти найчастіше висушують у розпилювальних сушарках. Після сушіння препарат повинен містити не більше 6–8 % вологи, тоді строк його зберігання в герметичній упаковці – до року практично без втрати активності. Висушений препарат стандартизують за активністю хлоридом натрію і фасують у крафт-мішки з поліетиленовими вкладками [8].

Отримання ферментних препаратів ліпаз із індексом Г10х. Для отримання очищеного ферментного препарату з індексом Г10х використовують фракційне осадження ультраконцентрату культуральної рідини органічними розчинниками [2] або проводять виділення ферменту методом висолування. Ліпази досить чут-

ливі до впливу розчинників, оскільки під їх дією досить часто спостерігається часткова денатурація білка, що може призвести до порушення організації активного центру та втрати активності. Тому для виділення ліпаз висолуванням частіше застосовують сульфат амонію, оскільки він добре розчинний у воді і на більшу частину ферментів не здійснює негативного впливу, а навпаки – навіть стабілізує, і тому при роботі з ним нема необхідності проводити фракціонування білків за низької температури. Важливо, щоб сульфат амонію був високої якості і не вносив у розчин токсичних домішок або вільної кислоти, що наявна в деяких зразках солі [8].

Порівняно з фракціонуванням у розчинах солей обробка органічними леткими речовинами, має ту перевагу, що отримання готового препарату і його висушування може бути виконане відразу, без попереднього діалізу розчинів, а отже, без розведення і часткової інактивності, які часто супроводжують діаліз.

Отримана суміш після фракціонування подається на сепаратор для відділення осаду. Далі осад переміщують у змішувач, де його розтирають із розчинником вихідної концентрації до утворення однорідної суспензії. Ця операція являє собою промивку осаду ферментів [4], який потім стандартизують бентонітом або желатином, що використовуються як наповнювач. Кількість наповнювача розраховують із врахуванням активності концентрату, готового продукту і втрат у процесі сушіння стандартизованого ферментного розчину. Отриманий напівпродукт направляють на висушування, яке можуть здійснювати у вакуумній, розпилювальній і сублімаційній сушарках [8].

1. Сушіння осадів, що мають вологість 70–80 %, проводять під вакуумом при обігріві водою з температурою 50–60 °С; через низький потенціал сушіння (рушійної сили масопереносу) його тривалість становить 14–16 год. Препарат завантажують на піддони шаром 10–15 мм і встановлюють їх на плити, що обігріваються водою, всередині герметичної камери, з якої вакуум-насосом постійно відкачується повітря.

2. У розпилювальній сушарці ферментний осад висушують за температури теплоносія на вході в сушарку 160 °С і на виході 60–75 °С. Режимом сушіння забезпечують досягнення 8 % вологості матеріалу. На цій стадії втрати матеріалу становлять 5–8 %.

3. Сублимаційне висушування відбувається в сублиматорі у три фази: самозаморожування, сублимація і видалення залишкової вологи випарюванням. Самозаморожування відбувається при інтенсивному випаровуванні частини вологи і безперервно зростаючому вакуумі. З матеріалу за період випаровування видалається 10–15 % вологи, при цьому частина капілярної і осмотично зв'язаної. В процесі сублимації видалається 40–50 % вологи і більше. В період випаровування залишкової вологи швидкість висушування весь час знижується, а температура підвищується.

Висушений осад розтирається в порошок у кульових млинах, молоткових дробарках або дисмембраторах [4].

Отримання високоочищених ферментних препаратів ліпаз. Технологія виробництва ферментних препаратів високої чистоти включає два основні етапи: а) виділення ферменту з культуральної рідини і його первинне концентрування та осадження; б) очистка виділеного ферментного білка хроматографічними методами, кристалізація білка [4].

Ліпази у високоочищеному і гомогенному вигляді виділені з дуже багатьох організмів зі ступенем очищення порівняно з вихідною культурою у 20–960 і більше разів вищим. Вихід активності в препараті також дуже різний – від десятих часток відсотка до 32 % [8].

Метод очистки ферментів із застосуванням хроматографії на колонках визнано найефективнішим серед методів розділення. Незалежно від того, на чому базується розділення білків – на адсорбції, іонному обміні, афінній хроматографії або на ефектах молекулярного сита, – техніка роботи практично у всіх випадках однакова. Процес починають із нанесення ферменту, розчиненого в розчиннику (буфері), на колонку, попередньо врівноважену з цим же розчинником. Потім або через колонку пропускають певний буферний розчин, або виділяють білок ступенево розчинами елюенту в зростаючій концентрації чи градієнтною елюцією або специфічним для виділюваного ферменту лігандом. Елюат збирають на колекторі фракцій. В отриманих фракціях визначають ферментативну активність і кількість білка.

До селективної очистки ферментів методами хроматографії належать такі.

1. *Адсорбція.* При виділення ферментів застосовується обмежене коло адсорбентів. У лабораторних роботах використовуються фосфат

кальцію (в кристалічній формі), відомій як гідроксилпатит, і алюміній (у формі γ -алюмогелю). За даними [21], адсорбційна хроматографія застосовується в 16 % проаналізованих схем очищення.

2. *Фракціонування за допомогою іонного обміну.* Для іонообмінної хроматографії ферментів зазвичай використовують похідні целюлози або смоли. Іонообмінна хроматографія є найбільш поширеним хроматографічним методом очистки ліпаз, який використовується в 67 % проаналізованих схем. Крім того, у 29 % випадків хроматографія використовується в технології більше одного разу.

Найчастіше використовуваними іонами є диетиламіноетил (DEAE) в аніонообмінній (58 %) і карбоксиметил (CM) у катіонообмінній (20 %) колонках. Сильні іони на основі триетиламіноетильних груп і Q-сефарози набувають все більшої популярності в очищенні ліпази.

3. *Ефект молекулярного сита.* Гель-фільтрація посідає друге місце за частотою використання при очищенні білків. Декстрини, що випускаються у вигляді сефадексів (більше 8 типів), дають змогу фракціонувати білки за розміром молекул з молекулярними масами приблизно до 250000; в цих же межах молекулярних мас функціонують і гранульовані поліакриламідні гелі. Гранульовані агарові гелі дають можливість фракціонувати білки з молекулярною масою в межах 50000–40000000. Гель-фільтрація використовується в 60 % схем очищення ліпази і в 22 % схем більше одного разу.

4. *Афінна хроматографія* – метод очистки і розділення ферментів, що базується на їх вибірковій взаємодії з лігандом, який ковалентно зв'язаний з інертним носієм. Афінна хроматографія використовується як стадія очистки в 27 % проаналізованих у праці [21] схем.

Для виділення й очистки мембранозв'язаної форми ліпази можна використовувати афінну хроматографію на груповому біоспецифічному сорбенті, що іммобілізований на гранульованому поліамідкефаліні. Такий спосіб дає змогу отримати гомогенну ліпазу.

Так, японська фірма “Тойокодьо” запатентувала спосіб очищення ліпаз із використанням сорбентів у вигляді солей вищих жирних кислот, які формуються у вигляді гранул або мікрокапсул. Фермент сорбується в них, а потім елюється ПАВ. Такий спосіб дає можливість одержувати високоочищені препарати з активністю до 90–95 % від вихідної [8].

До сучасних оригінальних технологій очищення ліпаз належать такі.

1. *Мембранні процеси* – використання двох типів капілярних мембран: поліакрилонітрил (PAN) і полісульфони (PS) з пропускною здатністю молекул з молекулярною масою нижче 10 кДа. Пропускна здатність цих мембран сильно знижується за наявності в розчині ліпази, особливо це виражено для гідрофільних PAN-мембран (зменшення потоку в 15 разів). При використанні PS-мембран спостерігалось зниження лише в 3 рази, яке збільшувалось із застосуванням концентрованого розчину ліпаз. Отже, PS-мембрани є ефективними для концентрування ферментних розчинів, у той час як PAN-мембрани більш придатні для їх попереднього фракціонування.

2. *Імуноочистка* є одним із найбільш селективних, дорогих і потужних методів афінного очищення білка й уможливорює очищення в 1000–10000 разів. Високоспецифічні антитіла можуть розрізняти дуже схожі антигени, а отже, можна подолати труднощі, пов'язані з розділенням, які іншими методами не вирішити.

Імуноафінне очищення здійснюють переважно з використанням моноклональних антитіл або афіноочищених поліклональних антитіл. Вибір залежить від доступності моноклональних антитіл до білка-мішені і складу неочищеного препарату, а саме типу і концентрації баластних речовин. Прикладів імуноного очищення ліпази в літературі наведено небагато.

3. *Хроматографія гідрофобної взаємодії з використанням поліетиленгліколю іммобілізованого на сефарозі*. Встановлено, що утримання ліпази *Chromobacterium viscosum* на колонці залежало від використовуваної солі, іонної сили та рН. При використанні 15 % фосфату калію як елюенту при рН 7,0 більша кількість ліпази затримується на колонці; промиванням 10 мМ фосфатним буфером було досягнуто відновлення 75 % білків і 79 % ЛА.

4. *Хроматографія гідрофобної взаємодії з використанням полівінілового спирту* – використовували зшитий полівініловий спирт, етерифікований з додекановою кислотою для гідрофобної хроматографії комерційного неочищеного препарату ліпази *Candida rugosa*. Затримані білки елюювали з колонки ступеневим підвищенням концентрації CHAPS (1,5; 6,0 і 20,0 ммоль/л) у буфері HEPES (4-(2-оксietил)-1-піперазинетансульфонова кислота) – EDTA, рН 7,6.

5. *Використання водних двофазових систем*. Поділ на фази є загальним явищем, яке відбувається, коли змішуються два розчини водорозчинних полімерів або полімер і розчин солі. Було розроблено процедуру очистки ліпази *Mucor miehei* з використанням поліетиленгліколю (ПЕГ) і фосфату натрію. Найкращими умовами для високого виходу відновленої ліпази були низька молекулярна маса полімеру (ПЕГ 400), високий рівень рН – вище ізоелектричної точки ліпази (рН 8,5) – і додавання NaCl у концентрації 0,5 М. Ліпазу очищали в два етапи: спочатку екстрагували у верхню фазу системи (3,3 % ПЕГ 6000, 15 % фосфату натрію, 1,9 % NaCl, рН 3,4), потім у нижню фазу додаванням 7 % фосфату натрію, 1 % NaCl, 42 % H₂O, рН 6,3. Ця двоступенева процедура на сьогодні використовується у 69 % методів очищення ліпази. При цьому вихід ферменту становить більше 80 % менш ніж за 1 год [21].

Коли фермент достатньо очищений, його вдається кристалізувати. Типовим методом кристалізації ферментів є додавання сульфату амонію до достатньо концентрованого розчину ферменту до появи слабкого помутніння. Потім концентрацію поступово підвищують, і наступний етап – це повільне випаровування. Кристалізацію проводять також при постійній концентрації солей, поступово змінюючи рН або температуру.

Іммобілізація ліпаз

Ліпази на сьогодні широко використовують у процесах гідролізу гліцеридів та інших складних ефірів [22]. Для розширення можливостей біоконверсії ліпідів необхідна іммобілізація ліполітичних ферментів [2].

Як правило, ліпази іммобілізують на такі носії, як аніонообмінні, катіонообмінні і хелатні смоли, гідрофобні носії, та використовують їх у реакціях етерифікації і трансетерифікації. Крім того, пропонується спосіб одержання іммобілізованих ліпазних частинок, який включає стадії отримання емульсії, де водна фаза, що розчиняє ліпазу, і речовина, що функціонує як носій ліпази, диспергуються у гідрофобній фазі з подальшим видаленням води з емульсії для перетворення її водної фази на тверді частинки, покриті ліпазою [23].

Фізичні методи іммобілізації ліпази поділяються на 4 групи: адсорбція на нерозчинних носіях; включення в пори гелю; просторове відділення ферменту від решти об'єму реакцій-

ної суміші за допомогою напівпроникної перегородки (мембрани); включення в двофазове реакційне середовище, де фермент розчинний і може міститися тільки в одній із фаз.

Аналіз даних літератури показує, що дослідники віддають перевагу саме адсорбції. Це пояснюється легкістю протікання процесу зв'язування, невисокою ціною носія і відсутністю токсичних речовин. Іммобілізація адсорбцією забезпечує велику площу поверхні, що важливо для ліполітичних ферментів, які здійснюють каталіз на поверхні поділу фаз. У більшості випадків адсорбція незначно знижує активність ліпаз і, що вкрай важливо, не впливає на їх специфічність.

Для іммобілізації ліполітичних ферментів за допомогою адсорбції використовують різноманітні носії: пористий нейлон і латекс, гідрофобний цеоліт, синтетичні смоли, поліпропілен, оксид алюмінію, кізельгур, амберліт тощо [22]. Так, для дослідження процесів адсорбції ліпази *Rhizopus oryzae* 1403 були вибрані носії – стиросорб МЕР 100 (ЦГ) й аніоніт АВ-17-2П [2]. Вибір сорбенту пов'язаний із використанням цієї ліпази в харчовій промисловості, адже стиросорб вже отримав застосування в харчовій промисловості для очищення сиропів у виробництві цукру [22]. Також перспективність носія полягає в ефективності зв'язування ліпази з ним, що становила 57,3 %, з аніонітом же вона не перевищувала 23 %. Для досягнення максимальної сорбції ліпази на стиросорбі її потрібно проводити за температури 30 °С і рН 6,5 протягом 60 хв. Висока активність і стабільність іммобілізованої ліпази дають змогу рекомендувати її для біоконверсії жирних продуктів [2].

Способи отримання іммобілізованої ліпази на сьогодні запатентовано. Ліпазу для очистки тваринних відходів і стічних вод іммобілізують у поліелектроліті таким чином:

1) як поліелектроліт використовують полідіалілдиметиламоній хлориду, при цьому іммобілізацію ліпази проводять при масовому співвідношенні ліпази і полідіалілдиметиламонію хлориду 1:1–100, рН 7,6–8,2, температурі 18–24 °С протягом 10–20 хв [24];

2) як поліелектроліт використовують полістиролсульфонат натрію, при цьому іммобілізацію ліпази проводять при масовому співвідношенні ліпази і полістиролсульфонату натрію 1:1–100, рН 7,6–8,2, температурі 18–24 °С протягом 10–20 хв [25];

3) як поліелектроліт використовують суміш полідіалілдиметиламонію хлориду і полістиролсульфонату натрію у співвідношеннях 1:0,3–1,0. При цьому іммобілізацію ліпази проводять при масовому співвідношенні ліпази і поліелектроліту 1:50–200, рН 9,0–11,0, температурі 18–24 °С протягом 10–20 хв [26].

Один зі способів отримання іммобілізованої ліпази з розміром частинок 250–300 нм полягає в розчиненні карбоксиметилцелюлози в буферному розчині або в підлученій дистильованій воді з рН 9,5–10, додаванні до фільтрату отриманого розчину панкреатичної ліпази, або мікробної ліпази з культури *Aspergillus niger*, або їх суміші з активністю не нижче 100 од./г у вигляді порошку за наявності 1–1,5 % розчину ПАР. Інтенсивність перемішування 4500–5000 об/хв, після чого емульсію охолоджують до 5–10 °С, зменшується рН реакційної суміші до 3,0–3,5 і суміш залишають на добу в холодильній камері. Для випадку в осад частинок, що містять ліпазу, при перемішуванні додають ацетатний буфер з рН 4–4,5, потім частинки висушують [27].

Одним із пріоритетних напрямів сучасної біотехнології є іммобілізація ферментів на поверхні клітин дріжджів. Цей спосіб закріплення ферменту має усі переваги стандартної іммобілізації на носіях (можливість багатократного використання, в низці випадків покращені промислово-цінні характеристики), при цьому він є природним варіантом іммобілізації і дає змогу відмовитися від найбільш затратних при виробництві ферментних препаратів стадій очистки ферменту і зв'язування його із сорбентом. Сама клітина виступає в цьому випадку як носій. Білок, який продукує клітина, виявляється зв'язаним із нею відразу після транспортування його назовні, тому приготування препарату з іммобілізованими ферментом зводиться лише до відділення клітин після ферментації і ліофілізації.

У нормі на поверхні клітин дріжджів розміщуються безліч білків, що беруть участь у побудові й підтримці клітинної стінки, різноманітні літичні ферменти, і в загальному випадку для іммобілізації ферментів на поверхні клітин до амінокислотної послідовності ферменту додають фрагмент або весь білок клітинної стінки. Отриманий рекомбінантний комплекс закріплюється на поверхні клітини за механізмом, властивим білку клітинної стінки.

Нині проводяться активні дослідження, спрямовані на вивчення механізмів закріплення білків на поверхні клітин, а також на отримання штамів – продуцентів ферментів, зокрема ліпази, іммобілізованої на поверхні клітинної стінки дріжджів [12].

Хімічні методи іммобілізації ферментів сьогодні є домінуючим способом отримання гетерогенних біокаталізаторів. Для іммобілізації препарату ліпази кращим носієм є аніонообмінна смола АВ-17-2П (випробуваний у цукрово-рафінадному виробництві аніоніт). Оптимальним методом іммобілізації є модифікований глутароальдегідний спосіб ковалентного зв'язування ферменту з носієм, що полягає у процесі нарощування зв'язної ланки між ліпазою і аніонітом при обробці низкою органічних реагентів. Встановлено, що іммобілізований препарат ліпази зберігає 23 % активності порівняно з розчинною формою ферменту [28].

Існуючі на сьогодні біокаталізатори мають низьку термостабільність через руйнування ферменту під дією температури. У зв'язку з цим актуальною проблемою є збільшення стабільності біокаталізаторів за рахунок використання ферментів, що проявляють високу термостабільність. Ю.В. Самойловою зі співавторами іммобілізовано ліпазу зі штаму бактерій роду *Geobacillus*. Цей штам є представником термофільних бактерій, виділених із термальних джерел долини гейзерів півострова Камчатка. Методом фізичної іммобілізації проведено адсорбцію ферменту на аніонообмінній смолі Lewatit MP-64 з функціональною третинною і четвертинною аміногрупами. Хімічну іммобілізацію ферменту проведено на амінованому силікагелі, що оброблений глутаровим альдегідом, з функціональною карбоксигрупою. Активність отриманого біокаталізатора становила 1300 од./г [13].

Методики визначення активності ліпаз

Визначення ліполітичної активності в цілому непроста задача, а методи, що існують на сьогодні, досить складні, незручні на практиці і, як правило, не мають високої чутливості. Так, наприклад, турбідиметричний і сталагмометричний методи, що засновані на вимірюванні змін фізичних властивостей реакційної суміші, не дають надійних результатів, оскільки ці фізичні властивості залежать від багатьох факторів, у т.ч. і від рН, наявності іонів мета-

лів. Ці методи не отримали широкого використання.

Традиційно для визначення активності ліпаз використовують метод алкаліметричного титрування. Чутливість методу визначення жирних кислот можна значно підвищити, використовуючи колориметричні методи. Метод рН-статування дає можливість визначати початкові швидкості ліпазної реакції, але він є відносно малочутливим і використовується лише в лужній області рН. Ще один високочутливий флуориметричний метод полягає у використанні синтетичних флуорогенних ацилгліцеридів [29].

Виробники ліполітичних препаратів

Ліпази, як правило, випускаються у вигляді комплексних препаратів, що містять, окрім ліпази, протеазу, амілазу, іноді целюлазу і пектиназу [8]. Препарати, що мають ліполітичну активність, випускаються в США (фірми Enzyme Development Corp., Equichem International Inc., Chr. Hansen, Wright Group The, Aalto Scientific, "Miles Chemical", "Rohm&Haas"), Японії ("Amano Enzyme" Co. Ltd., "Meito", "Sangyc", "Nagase"), Нідерландах (Clea Technologies B.V., "Gist Brocades"), Франції ("Rapidade"), Індії (Advanced enzymes), Аргентині (Ran Industrias Quimica), Данії ("Novozymes"), Фінляндії ("FINNFEEDS OY"), Китаї ("Sekisui Enzymes") [9, 16].

Висновки

Використання ліпаз у народному господарстві є вигідним як з економічної, так і з екологічної точки зору. Перелік галузей народного господарства, в яких ці ферменти вже успішно використовуються або плануються до використання, постійно розширюється.

На сьогодні головним джерелом отримання ліполітичних ферментних препаратів є широке коло мікроорганізмів різних таксономічних груп, добра генетична вивченість більшості з яких дає змогу здійснювати маніпуляції щодо підвищення виходу цільового продукту. Проведений літературний, зокрема патентний, пошук сучасних продуцентів виявив серед них бактерії, актиноміцети, дріжджі та мікроскопічні гриби.

За механізмом дії ліпаза належить до ферментів класу гідролаз (КФ 3.1.1.3) і каталізує

гідроліз складноєфірних зв'язків у тригліцеридах з утворенням жирної кислоти та гліцерину. Властивості ліпаз залежать від продуцента.

Культивування продуцентів ліпаз здійснюється глибинним способом; у складі живильного середовища важливим є підвищений вміст азоту та наявність індукторів біосинтезу ліпідної природи або ПАР.

Виділення й очистка ліпаз є багатостадійним процесом, який зупиняють на визначених стадіях залежно від вибраного кінцевого ступеня очистки – Г2х, Г3х, Г10х, високоочищений ферментний препарат.

Для одержання високоочищених ферментних препаратів ліпаз найчастіше використовують фракціонування за допомогою іонного обміну та гель-фільтрацію.

Імобілізація ліпази – це крок для розширення можливостей біоконверсії ліпідів завдяки

підвищенню активності та стабільності ферменту в органічних розчинниках. Серед фізичних методів використовують адсорбційну іммобілізацію, серед хімічних – спосіб ковалентного зв'язування ферменту з носієм. Розглядається можливість іммобілізації ліпази на поверхні клітин дріжджів.

Для визначення активності ліпаз найчастіше використовують метод алкаліметричного титрування та колориметричний метод. Існують різні варіанти виконання методик залежно від необхідної чутливості та специфічності методу.

Виробництво ферментного препарату ліпаза більшою мірою налагоджено за кордоном.

Проведений огляд дасть можливість окреслити основні напрями розробки вітчизняних ліполітичних ферментних препаратів.

Список літератури

1. Янышева Н.В. Выделение, иммобилизация и практическое использование липолитического комплекса *Rhizopus oryzae* 1403: Дис. ... канд. хим. наук: 03.02.05. – М., 2005. – 203 с.
2. Шеламова С.А. Научно-практические аспекты технологии модификации растительных масел для жировых продуктов с функциональными свойствами: Автореф. дис. ... докт. техн. наук: 25.12.2012. – М., 2012. – 50 с.
3. Селекція продуцентів позаклітинної ліпази для використання в біотехнології / А.В. Борисенко, М.М. Антонюк, В.Л. Айзенберг та ін. // Наукові праці НУХТ. – 2010. – № 33. – С. 35–37.
4. Цыперович А.С. Ферменты (основы химии и технологии). – К.: Техніка, 1971. – 361 с.
5. *Продукция*: липазы // ВИАТ Пищевые добавки для молочной и мясной промышленности. – Режим доступа: <http://viat21.ru/site/16>.
6. *Липаза* // Медицинский центр “Наследственность”, диагностическая лаборатория. – Режим доступа: <http://www.nasled.com/?id=750>.
7. *Маленькие помощники мельников* // The company Mühlenchemie. – Режим доступа: <http://www.muehlenchemie.de/downloads-expertenwissen/mc-enzyme-popperus.pdf>.
8. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов: Учеб. для студ. – М.: Элевар, 2000. – 512 с.
9. Основные аспекты использования липаз для получения биодизеля / А.В. Гарабаджиу, В.А. Галынкин, М.М. Карасев и др. // Управление научных исследований СПбГТИ (ТУ). – 2010. – № 33. – С. 63–68.
10. *Использование* липазы *Yarrowia lipolytica* W 29 для утилизации отходов масложировой промышленности / О.С. Корнеева, В.С. Капраников, Е.А. Мотина и др. // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 10. – С. 75–76.
11. *Рекомбинантный* штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica* – продуцент липазы: Пат. 2451075 РФ: МПК⁷ C12N9/20 / Т.В. Выборная, Т.В. Юзбашев, Т.И. Соболевская и др.; заявитель и патентообладатель Федерал. гос. унитарное предприятие “Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов”. – № 2011113670/10: Заявлено 08.04.2011: Оpubл. 20.05.2012.
12. *Штамм* дрожжей *Yarrowia lipolytica* – продуцент клеточно-связанной липазы: Пат. 2475532 РФ: МПК⁷ C12N1/19, C12N15/55, C12R1/645 / Е.Ю. Юзбашева, Т.В. Юзбашев, Т.Л. Гордеева и др.; заявитель и патентообладатель Федерал. гос. унитарное предприятие “Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов”. – № 2012104504/10: Заявлено 09.02.2012: Оpubл. 20.02.2013.
13. *Разработка* биокатализатора для переэтерификации пищевых жиров с использованием иммобилизованных ферментов липаз / Ю.В. Самойлова и др. // Высокие технологии в современной науке и технике. – 2013. – Секция 4. – С. 119–123.
14. V. Gunasekaran and D. Das, “Lipase fermentation: Progress and prospects”, *Indian J. Biotechnol.*, vol. 4, pp. 437–445, 2005.

15. *A. Robert*, Copeland Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. Wiley-VCH, Inc., 2000, 390 p.
16. Дослідження ефективності ферментів щодо гідролітичного розщеплення жирів / П.О. Некрасов, Ю.М. Плахотна, О.П. Некрасов // Вісник нац. техн. ун-ту ХПІ. – 2011. – № 31. – С. 3–10.
17. Штамм бактерій *Serratia marcescens* – продуцент ліпазы: Пат. 2475532 РФ: МПК⁷ С12N9/20, С12N9/20, С12R1:43 / А.Б. Дужак, З.И. Панфилова, Р.И. Салганик; заявитель и патентообладатель Ин-т цитологии и генетики СО РАН. – № 97104288/13: Заявлено 12.03.1997: Оpubл. 10.05.2000.
18. Штамм бактерій *Serratia species* – продуцент ліпазы: Пат. 2308485 РФ: МПК⁷ С12N9/20, С12N1/20 / О.Н. Логинов, Н.В. Паканешикова, Н.Н. Силищев и др.; заявитель и патентообладатель ЗАО НПП “Биомедхим”. – № 2006324514/10: Заявлено 13.03.2006: Оpubл. 20.10.2007.
19. Спосіб біосинтеза ліпазы: Пат. 2397247 РФ: МПК⁷ С12N9/20, С12R1:845. / С.А. Шеламова; заявитель и патентообладатель Гос. образов. учреждение высшего проф. образования “Воронежская государственная технологическая академия”. – № 2008152363/10: Заявлено 29.12.2008: Оpubл. 20.08.2010.
20. Шеламова С.А., Тырсин Ю.А. Индукция биосинтеза липаз микромицетом // Вестник ОГУ. – 2012. – № 1. – С. 172–176.
21. *R.K. Saxena et al.*, Purification strategies for microbial lipases, *J. Microbiological Methods*, vol. 52, p. 18, 2002.
22. Адсорбция ліпазы на гидрофобном носителе / С.А. Шеламова, В. Ф. Селеменев, И. А. Крылов и др. // Биотехнология. – 2007. – № 3. – С. 52–57.
23. Порошкообразный препарат ліпазы, способ его получения и применения: Пат. 2447148 С1 РФ: МПК⁷ С12N 9/16, С12N 7/62 / Дз. Сузуки, Й. Ямаути, Т. Манабе, С. Негисе; заявитель и патентообладатель Дзе Ниссин Ойллио групп, ЛТД. – № 2009138225/10: Заявлено 27.04.2011: Оpubл. 10.04.2012.
24. Спосіб получения иммобилизованной ліпазы: Пат. 2301831 С1 РФ: МПК⁷ С12N 11/08, С12N 9/20 / С.Ю. Зайцев, Е.В. Тульская, Т.В. Каштиго и др.; заявитель и патентообладатель Федерал. гос. образов. учреждение высшего проф. образования “Московская государственная технологическая академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина”. – № 2006111373/13: Заявлено: 10.04.2006: Оpubл. 27.06.2007.
25. Спосіб получения иммобилизованной ліпазы: Пат. 2308486 С1 РФ: МПК⁷ С12N 11/08, С12N 9/20 / С.Ю. Зайцев, Е.В. Тульская, Т.В. Каштиго и др., заявитель и патентообладатель Федерал. гос. образов. учреждение высшего проф. образования “Московская государственная технологическая академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина”. – № 2006111374/13: Заявлено 10.04.2006: Оpubл. 20.10.2007.
26. Спосіб получения иммобилизованной ліпазы: Пат. 2301830 С1 РФ: МПК⁷ С12N 11/08, С12N 9/20 / С.Ю. Зайцев, Е.В. Тульская, Т.В. Каштиго и др., заявитель и патентообладатель Федерал. гос. образов. учреждение высшего проф. образования “Московская государственная технологическая академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина”. – № 2006111372/13: Заявлено 10.04.2006: Оpubл. 27.06.2007.
27. Спосіб получения иммобилизованной ліпазы: Пат. 2389792 С1 РФ: МПК⁷ С12N 11/12, С12N 9/20 / А.Д. Неклюдов, А.Н. Иванкин, О.П. Прошина, Г.Л. Олиференко; заявитель и патентообладатель Федерал. агентство по образов., Гос. образов. учреждение высшего проф. образования “Московский государственный университет леса”. – № 2008126752/13: Заявлено 02.07.2008: Оpubл. 20.05.2010.
28. Иммобилизация гидролитических ферментов на анионитах / Т.А. Ковалева, О.М. Кожокина, О.П. Багно и др. // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – 8, вып. 6. – С. 1035–1041.
29. Биферментная система ліпаза/ліпоксигеназа в обращенных мицеллах АОТ в октане / И.М. Павленко, О.С. Купцова, Н.Л. Клячко и др. // Биоорганическая химия. – 2002. – 28, № 1. – С. 50–55.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції
28 лютого 2014 року