

УДК 579.841.31.4.577.152.321.152

Профессор В.С. Григоров, доцент А.Н. Яковлев,  
доцент С.Ф. Яковлева, магистрант Т.С. Ковалева  
(Воронеж. гос. ун-т инж. технол.) кафедра биохимии и биотехнологии.  
тел. (473) 255-55-57  
E-mail: svetlana.yakovleva.68@mail.ru

Professor V.S. Grigorov, associate Professor A.N. Iakovlev,  
associate Professor S.F. Iakovleva, master student T.S. Kovaleva  
(Voronezh state university of engineering technologies) Department of biochemistry and  
biotechnology. phone (473) 255-55-57  
E-mail: svetlana.yakovleva.68@mail.ru

## **Биосинтез глюкоамилаз, аминокислот, жирных кислот липидов термотолерантным и мезофильным штаммами рода *Aspergillus* при различных температурах**

## **Biosynthesis glucoamylase, amino acids, fatty acids, lipids thermotolerant and mesophilic strains of the genus *Aspergillus* at different temperatures**

Реферат. Активный синтез ферментов термотолерантными микромицетами при повышенных температурах стимулируется наличием в среде кислых аминокислот. У мезофильных микромицетов увеличивается содержание ненасыщенных жирных кислот и снижается активность ферментов. Изучено влияние повышенных температур на биосинтез глюкоамилаз и количественное изменение некоторых низкомолекулярных компонентов в клетках аспергилловых грибов. Объектом исследования были взяты микромицеты *Aspergillus awamori* ВУД-Т-2 и *Aspergillus awamori* штамм чешский. Штаммы культивировались в течение 96 ч при температурах 30, 40, 45 °С в колбах емкостью 750 см<sup>3</sup> на шуттель - аппарате с частотой вращения 4 с<sup>-1</sup>. Установлено, что повышение температуры культивирования термотолерантного микромицета с 30 до 45 °С в течение 96 ч способствует увеличению содержания внутриклеточных аминокислот, особенно глутаминовой и аспарагиновой, а также полярных липидов и моноацилглицеридов, триглицеридов и жирных кислот с четным числом углеродных атомов. Повышение температуры культивирования термотолерантного штамма способствовало увеличению содержания этих липидных фракций; у мезофильного штамма их содержание снижалось при 45 °С. В мицелии гриба *Aspergillus awamori* ВУД-Т-2 повышение температуры вызывает усиление синтеза пальмитиновой и стеариновой кислот, количество линолевой и линоленовой снижается. Из штамма *Aspergillus awamori* штамм чешский количество насыщенных жирных кислот мало изменяется, ненасыщенных – снижается. Глюкоамилазная активность в мицелии и культуральной жидкости термотолеранта достигает максимума при 45 °С, у мезофила – при 40 °С. Таким образом, при супраоптимальных температурах культивирования *Aspergillus awamori* ВУД-Т-2 усиливается метаболические процессы продуцента за счет взаимодействий гидрофобных аминокислот и аминокислот с ионизированными СООН-группами, увеличивается содержание насыщенных жирных кислот, что способствует повышению биосинтеза глюкоамилазы, чего не отмечено у мезофильного штамма.

Summary. Active enzyme synthesis micromycetes thermotolerance at elevated temperatures incentives presence of acidic amino acids in the medium. In mesophilic micromycetes increased content of unsaturated fatty acids and reduced enzyme activity. The effect of elevated temperature on the biosynthesis of glucoamylases and quantitative changes of some low molecular weight components in cells *Aspergillus* fungi. The object of the Exploration were taken micromycetes *Aspergillus awamori* WUD-T-2 and *Aspergillus awamori* Czech strain. Strains were cultivated for 96 hours at temperatures of 30, 40, 45 °C in 750 cm<sup>3</sup> flasks on shuttel - unit with a frequency of rotation of the 4-to-1. It has been established that the increase of the temperature of cultivation thermotolerance micromycetes from 30 to 45 °C in those chenie 96 h increases intracellular content of amino acids, especially glutamic and aspartic and mono acyl glyceride and polar lipids, triglycerides of fatty acids having an even number of carbon atoms. Increasing the temperature of cultivation thermotolerance strain helped to increase the content of these lipid fractions; at mesophilic strain their content decreased at 45 °C. In the mycelium of the fungus *Aspergillus awamori* WUD-T-2, an increase in temperature causes an increase in the synthesis of palmitic and stearic acids, linoleic and linoene decreases. From a strain of *Aspergillus awamori* штамм чешский Czech amounts of saturated fatty acids has changed little, is unsaturated - is reduced. Glucoamylase activity in the mycelium and culture fluid thermotolerance achievement-a maximum at 45 °C, in the mesophile - at 40 °C. Thus, at supraoptimal temperatures culturing *Aspergillus awamori* WUD-T-2 is enhanced metabolic processes producing by hydrophobic interactions and s-amino acids with the ionized-COOH groups increased content of saturated fatty acids, thereby increasing biosynthesis glucoamylase, which was not observed in mesophyll strain.

**Ключевые слова:** микромицет, аминокислоты, липиды, фермент, температура, pH-среды

**Keywords:** micromycetes, amino acids, lipids, an enzyme, temperature, pH of the medium

---

© Григоров В.С., Яковлев А.Н.,  
Яковлева С.Ф., Ковалева Т.С., 2014

По изменению количественного состава клеточных метаболитов в процессе их биосинтеза можно выяснить причину термостойкости некоторых микроорганизмов.

Известно, что высокое содержание в клетке цистеина способствует термостойкости мембранного белка [1].

Активный синтез ферментов термотолерантными микромицетами при повышенных температурах стимулируется наличием в среде кислых аминокислот [2]. У мезофильных микромицетов увеличивается содержание ненасыщенных жирных кислот и снижается активность ферментов [3].

Литературных данных для термотолерантных и мезофильных микромицетов рода *Aspergillus* по этому вопросу представлено недостаточно.

В настоящей работе изучено влияние повышенных температур на биосинтез глюкоамилаз и количественное изменение некоторых низкомолекулярных компонентов в клетках аспергилловых грибов.

Объектом исследования были взяты микромицеты *Aspergillus awamori* ВУД-Т-2 и *Aspergillus awamori* штамм чешский [4]. Штаммы культивировались в течение 96 ч при температурах 30, 40, 45 °С в колбах емкостью 750 см<sup>3</sup> на шуттель - аппарате с частотой вращения 4 с<sup>-1</sup>.

Глюкоамилазную активность (ГЛА) штаммов определяли глюкозооксидазным методом [5].

Свободные аминокислоты экстрагировали из разрушенного мицелия горячим этанолом. Спиртовые растворы выпаривали и остаток растворяли в 10 см<sup>3</sup> ацетатного буфера рН 2,0. Разделение экстрагированных аминокислот проводили на аминокислотном анализаторе Hd 1200 Е Их содержание в 1 г биомассы рассчитывали по формуле:

$$x = \frac{SVMk}{S_1 \cdot H} \cdot V, \quad (1)$$

где  $x$  – количество аминокислоты, % от асб;  $S$  – площадь пика аминокислоты;  $S_1$  – площадь пика стандартного раствора аминокислоты;  $M$  – молекулярная масса аминокислоты;  $k$  – коэффициент поправки объема дозирующего устройства = 1;  $H$  – навеска;  $V$  – объем гидролизата.

Экстракцию липидов из мицелия микромицетов проводили методом [6]. Количественный и качественный состав определяли хроматографически: количественный – денситометрически [7].

Денситограммы рассчитывали методом внутренней нормализации по формуле:

$$Гл = \left( \frac{S_i}{\sum_{i=1}^n S_i} \right) \cdot 100 \%, \quad (2)$$

где Гл – группа липидов;  $S_i$  – площадь  $i$ -го компонента.

Для выделения липидов использовали свидетели с значениями  $R_f$  [8].

Жирокислотный состав нейтральных липидов определяли на газожидкостном хроматографе ЛХМ – 8МД с пламенным детектором.

В мицелий аспергилловых микромицетов входили полярные липиды и моноацелглицерины (Пол + Мг), диацилглицеринглы (Дг), стерин (С), жирные кислоты (Ж<sub>к</sub>), триглицерины (Т<sub>г</sub>).

Образование внутриклеточных аминокислот и биосинтез глюкоамилаз термотолерантным и мезофильным микромицетами при изменении температуры культивирования представлены в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Влияние температуры на биосинтез глюкоамилазы и внутриклеточных аминокислот микромицетами

| t.<br>°C                          | τ. ч | ГЛА          |                                  | Биомасса, г<br>СВ/100 см <sup>3</sup> | Содержание аминокислоты, % от СВ б/м |      |      |      |      |      |      |      |
|-----------------------------------|------|--------------|----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
|                                   |      | Миц,<br>ед/г | КЖ,<br>ед/100<br>см <sup>3</sup> |                                       | Глу                                  | Асп  | Лиз  | Тре  | Лей  | Цис  | Вал  | Изо  |
| Aspergillus awamori ВУД-Т-2       |      |              |                                  |                                       |                                      |      |      |      |      |      |      |      |
| 30                                | 24   | 15,3         | 300                              | 2,0                                   | 0,71                                 | 0,44 | 0,09 | 0,15 | 0,08 | 0,42 | 0,03 | 0,02 |
|                                   | 96   | 17,5         | 1100                             | 1,7                                   | 0,85                                 | 0,51 | 0,28 | 0,13 | 0,07 | 0,48 | 0,16 | 0,15 |
| 45                                | 24   | 18,4         | 400                              | 2,0                                   | 0,80                                 | 0,56 | 0,22 | 0,19 | 0,10 | 0,46 | 0,20 | 0,12 |
|                                   | 96   | 17,7         | 1200                             | 1,5                                   | 0,96                                 | 0,80 | 0,29 | 0,16 | 0,13 | 0,52 | 0,33 | 0,28 |
| Aspergillus awamori штамм чешский |      |              |                                  |                                       |                                      |      |      |      |      |      |      |      |
| 30                                | 24   | 10,5         | 280                              | 1,8                                   | 0,30                                 | 0,30 | 0,08 | 0,12 | 0,09 | 0,21 | 0,09 | 0,05 |
|                                   | 96   | 8,7          | 275                              | 1,3                                   | 0,33                                 | 0,36 | 0,09 | 0,10 | 0,09 | 0,30 | 0,12 | 0,11 |
| 45                                | 24   | 3,3          | 80                               | 1,0                                   | 0,09                                 | 0,08 | 0,04 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,03 | 0,02 |
|                                   | 96   | 2,3          | -                                | -                                     | -                                    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |

Из таблицы 1 видно, что повышение температуры культивирования термотолерантного микромицета с 30 до 45 °С в течение 96 ч способствует увеличению содержания внутриклеточных аминокислот, особенно Глу и Асп у мезофильного незначительное увеличение отмечается только при 30 °С. Глюкоамилазная активность мицелия термотолеранта мало изменяется, но возрастает в культуральной жид-

кости. У мезофильного штамма она существенно снижается и в мицелии в КЖ.

Мицелий первого штамма представляет собой рыхлую войлокообразную массу; мезофильный штамм слабо образует мицелий в виде разновеликих шарообразных форм.

Изменение количества липидного и жирнокислотного состава в мицелии под действием различных температур сведены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

Влияние температуры на биосинтез глюкоамилазы, липидный и жирнокислотный состав мицелия микромицетов

| t.<br>°С                          | τ.<br>ч | ГЛА          |                               | Биомасса,г<br>СВ/100 см <sup>3</sup> | Содержание липидов и ЖК, % от суммы содержания |     |      |     |      |           |           |           |  |
|-----------------------------------|---------|--------------|-------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------|-----|------|-----|------|-----------|-----------|-----------|--|
|                                   |         | Миц,<br>ед/г | КЖ,<br>ед/100 см <sup>3</sup> |                                      | Пол+<br>Мг                                     | Дг  | С    | Жк  | Тг   | С<br>15:0 | С<br>16:0 | С<br>18:0 |  |
| Aspergillus awamori ВУД-Т-2       |         |              |                               |                                      |                                                |     |      |     |      |           |           |           |  |
| 30                                | 24      | 15,3         | 310                           | 1,3                                  | 15,5                                           | 1,7 | 10,9 | 4,9 | 70,3 | 0,3       | 0,5       | 13,6      |  |
| 40                                | 48      | 16,7         | 1120                          | 1,6                                  | 17,5                                           | 1,9 | 13,0 | 5,5 | 75,3 | 0,4       | -         | 15,0      |  |
| 45                                | 96      | 17,8         | 2213                          | 1,2                                  | 18,0                                           | 1,7 | 12,9 | 5,3 | 77,0 | -         | -         | 15,0      |  |
| Aspergillus awamori штамм чешский |         |              |                               |                                      |                                                |     |      |     |      |           |           |           |  |
| 30                                | 24      | 10,4         | 275                           | 1,4                                  | 26,8                                           | 2,7 | 11,0 | 6,0 | 25,0 | 0,8       | 2,6       | 6,2       |  |
| 40                                | 48      | 11,5         | 160                           | 1,2                                  | 27,0                                           | 2,6 | 10,0 | 6,9 | 21,3 | 0,6       | 2,7       | 5,3       |  |
| 45                                | 96      | 2,4          | 65                            | 0,6                                  | 15,3                                           | 1,0 | 8,7  | 4,0 | 12,3 | -         | -         | 5,0       |  |

Как видно из таблицы 2, оба штамма при повышении температуры содержали наибольший процент полярных липидов и миноациглицеридов (Пол+Мг), триглицеридов (Тг) и жирных кислот с четным числом углеродных атомов.

Повышение температуры культивирования термотолерантного штамма способствовало увеличению содержания этих липидных фракций; у мезофильного штамма их содержание снижалось при 45 °С. В мицелии гриба *Aspergillus awamori* ВУД-Т-2 повышение температуры вызывает усиление синтеза пальмитиновой и стеариновой кислот, количество линолевой и линоленовой снижается. Из штамма *Aspergillus awamori* штамм чешский количество

насыщенных жирных кислот мало изменяется, ненасыщенных – снижается.

Глюкоамилазная активность в мицелии и культуральной жидкости термотолеранта достигает максимума при 45 °С, у мезофила – при 40 °С.

Таким образом, при супраоптимальных температурах культивирования *Aspergillus awamori* ВУД-Т-2 усиливается метаболические процессы продуцента за счет взаимодействий гидрофобных аминокислот и аминокислот с ионизированными СООН-группами, увеличивается содержание насыщенных жирных кислот (Пол + Мг), Дг, Тг, что способствует повышению биосинтеза глюкоамилазы, чего не отмечено у мезофильного штамма.

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Ruwan M.Y., Hang A. Membrane properties of *Thermoplasma acidophils* // Biochem. 1984. № 14.
- 2 Амелунксен Р., Медок Э. Жизнь микробов в экстремальных условиях. М.: Мир, 1981. 254 с.
- 3 Sawteki F.H., Diesno M.Y. The effect Temperature on the Fatti acid Phospholipid composition of *Cephalosporum kiltense* // Lipids. 1987. V. 12. № 1.
- 4 Яковлев А.Н. Биосинтез и физико-химические свойства термо- и рН-стабильных амилаз термотолерантного микромицета *Aspergillus awamori* ВУД-Т-2: дисс. ... канд. техн. наук. Воронеж: ВТИ, 1992.

- 5 Польшалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов. М.: Де Липракт, 2003.
- 6 Виркемип Д.Ж. Биохимическое исследование мембран. М.: Мир, 1980. С. 227 – 253.
- 7 Нечаев А.Н., Сандлер Х.Я. Липиды зерна. М.: Колос, 1985. С. 158.
- 8 Мангольд Х. Хроматография в тонких слоях. М.: Мир, 1985. С. 149.

REFERENCES

- 1 Ruwan M.Y., Hang A. Membrane properties of *Thermoplasma acidophils*. *Biochem.*, 1984, no. 14.
- 2 Amelunksen R., Medok E. Zhizn' mikrobov v ekstremal'nykh usloviyakh [Microbial life in extreme environments]. Moscow, Mir, 1981. 254 p. (In Russ.).
- 3 Sawteki F.H., Diesno M.Y. The effect Temperature on the Fatty acid Phospholipid composition of *Cephalosporium kiltense*. *Lipids.*, 1987, vol. 12, no. 1.
- 4 Iakovlev A.N. Biosintez i fiziko-khimicheskie svoystva termo- i pH-stabil'nykh amilaz termotolerantnogo mikromizeta *Aspergillus awamori* VUD-T-2. Diss. kand. takh. nauk [Biosynthesis, and physicochemical properties of heat and pH-amylase stable thermotolerance micromycetes *Aspergillus awamori* WUD-T-2. Cand. tech. sci. diss.]. Voronezh, VTI, 1992. (In Russ.).
- 5 Polygalina G.V., Cherednichenko V.S., Rimareva L.V. Opredelenie aktivnosti fermentov [Definition of efficiency of enzymes]. Moscow, De Liprakt, 2003. (In Russ.).
- 6 Virkemip D.Zh. Biokhimicheskoe issledovanie membrane [Biochemical research of membranes]. Moscow, Mir, 1980. pp. 227 - 253. (In Russ.).
- 7 Nechaev A.N., Sandler Kh. Ia. Lipidy zerna [Lipids of grain]. Moscow, Kolos, 1985. 158 p. (In Russ.).
- 8 Mangol'd Kh. Khromatografiya v tonkikh sloiakh [Chromatography in thin layers]. Moscow, Mir, 1985. 149 p. (In Russ.).