

тивности микроорганизмов с целью разработки технологии утилизации жиродержащих отходов масложировой промышленности.

В качестве продуцента липазы использовали культуру дрожжей *Yarrowia lipolytica* W 29. Культивирование проводили в качалочных колбах объемом 750 мл при температуре 28 – 30⁰ С на среде следующего состава: глюкоза, MgSO₄, дрожжевой экстракт, K₂HPO₄, CaCO₃, мочевины, пептон, соевая мука, оливковое масло; при начальном значении pH = 7,0 – 7,3. В качестве субстрата применяли поливиниловый спирт и подсолнечное масло. Гидролиз проводили при 37⁰ С в течение 1 часа, после чего добавляли 15 мл этилового спирта и продукты гидролиза оттитровывали 0,1 Н раствором NaOH в присутствии 1%-ного раствора фенолфталеина. Раствор фермента в контрольных образцах добавляли непосредственно перед титрованием. Липолитическую активность выражали в мкмоль олеиновой кислоты, освобождающейся за 1 час в результате гидролиза субстрата.

Нами проводились работы по замене подсолнечного и оливкового масла на отход масложировой промышленности – soapstock, состоящий из 40 % жировой части и 60 % воды.

Для адаптации микроорганизма происходили частичную замену МПА на soapstock до 50 %.

Установлено, что замена оливкового масла на soapstock в составе питательной среды при культивировании дрожжей *Yarrowia lipolytica* W 29 приводит к незначительному снижению липолитической активности.

При гидролизе подсолнечного масла и soapstock в качестве субстрата образуется равное количество выделившихся свободных кислот.

Таким образом, исследуемая нами липаза *Yarrowia lipolytica* W 29 может быть успешно использована для гидролиза soapstock с целью выделения свободных жирных кислот.

КАРБОГИДРАЗЫ: СТРУКТУРА И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ

Корнеева О.С., Черемушкина И.В.,
Свиридова Т.В., Чигирин Н.А.

ГОУВПО «Воронежская

государственная технологическая академия»,
Воронеж

Одной из наиболее актуальных проблем современной энзимологии является исследование структуры ферментов и расшифровка механизма их каталитического действия. Особого внимания в этих исследованиях заслуживают карбогидразы (О-гликозидгидролазы), так как реакции ферментативного гидролиза олиго- и полисахаридов обусловлены как сугубо фундаментальными, так и прикладными задачами.

В связи с этим нами исследована структура активных центров и кинетика действия ряда гликозидаз: инулиназы, β-фруктофуранозидазы, β-галактозидазы, что позволило выявить общие закономерности катализируемых ими реакций и развить идею об идентичности механизма расщепления гликозидных связей в олиго- и полисахаридах.

Установлено, что каталитически активными группами в исследованных нами карбогидразах являются карбоксильная группа либо аспарагиновой, либо глутаминовой аминокислот и имидазольная группа гистидина. Наличие в каталитических центрах карбогидраз карбоксильной и имидазольной групп дает основание считать, что механизм расщепления гликозидных связей в олиго- и полисахаридах этими ферментами идентичен.

Особенности строения активных центров исследуемых ферментов, проявляются в их субстратной специфичности, в частности по отношению к длине субстрата.

Как истинная галактозидаза, β-галактозидаза *Penicillium canescens* специфична к гликоновой части молекулы субстрата и проявляет меньшую специфичность к агликону.

Специфичность и характер действия фруктозидаз были исследованы в реакциях гидролиза различных фруктозосодержащих поли- и олигосахаридов. Установлено, что инулиназа *Aspergillus awamori* и кроме инулина способна гидролизовать стахиозу, раффинозу, сахарозу и леван, то есть проявляет химическое сродство как к β-2,1-, так и β-2,6-фруктозидной связи в олигофруктозидах. Анализ продуктов гидролиза субстратов инулиназой из *A. awamori* методом ВЭЖХ показал, что основным продуктом этой реакции является фруктоза, и фермент относится к экзодействующим гликозидгидролазам. Активность экзоинулиназы *A. awamori* по отношению к левану и β-2,6-фруктоолигосахаридам со степенью полимеризации 3 – 6 выгодно отличает ее от других инулиназ, однако скорость гидролиза левана существенно ниже, чем скорость гидролиза инулина, что объясняется различиями в пространственной структуре этих фруктанов.

Для того, чтобы выяснить, с какими особенностями в молекулах дрожжевых β-фруктозидаз связаны их инвертазная и инулиназная активности, исследовали способность β-фруктозидазы *Kluyvermyces marxianus* к гидролизу различных фруктоолигосахаридов. Полученная высокоочищенная β-фруктозидаза также гидролизовала наряду с сахарозой раффинозу, стахиозу, инулин и леван. При кислотной и термической инактивации отношение инулиназной активности (I) фермента к инвертазной (S) было постоянной величиной. Способность гидролизовать леван отмечена и для некоторых других инвертаз. Проявление активности фермента по отношению к левану заслуживает особого внимания, так как даже многие инулиназы не гидролизуют данный полисахарид. Способность гидролизовать любой субстрат с β-фруктозидной связью не является очевидной особенностью каждой β-фруктозидазы.

Таким образом, изучение структуры активных центров карбогидраз и субстратной специфичности их действия позволило выявить общие закономерности катализируемых ими реакций.